



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

**Caracterización electrofisiológica de un canal de
potasio de dos dominios de poro del acocil
*Procambarus clarkii***

TESIS

Que presenta:

Biól. Juan Manuel Hernández Martínez

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

Para la realización del presente trabajo se contó la beca CONACYT (859060). 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

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

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

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

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

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

A todos mis amigos y compañeros de la generación y del laboratorio que me han apoyado y de quienes he aprendido tanto, son de gran importancia para mí y para toda mi vida.

Al Cinvestav por permitirme crecer como profesionista y persona.

A mis sinodales de tesis; la Dra. María del Refugio García Villegas y al Dr. Jorge Noel Quevedo Durán por la revisión y asesoramiento durante la realización y conclusión de este trabajo.

Contenido

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
I. Canales de potasio (K ⁺).....	3
II. Canales de potasio con dos dominios de poro K2P	7
i. Estructura de las subunidades formadoras de los canales K2P	8
ii. Características biofísicas y farmacológicas de los canales K2P.....	10
iii. Subfamilias de los canales K2P.....	12
1) TWIK, canales rectificadores entrantes débiles de K ⁺	13
2) TASK, canales de K ⁺ sensibles a pH ácido relacionados con TWIK	14
3) TALK, canales de K ⁺ activados por pH alcalino relacionados con TWIK	15
4) THIK, canales de K ⁺ inhibidos por halotano	15
5) TRESK, canales de K ⁺ de la médula espinal relacionados con TWIK.....	16
III. Subfamilia TREK, los integradores de estímulos	17
i. Patrón de expresión de la subfamilia TREK.....	18
ii. Características electrofisiológicas y dependencia al voltaje	18
iii. Modulación de la subfamilia TREK	20
IV. Sistema órgano X - glándula sinusal.....	22
V. Antecedentes	24
VI. Hipótesis.....	28
VII. Objetivo general.....	28
VIII. Objetivos particulares	28
Materiales y métodos	29
I. Amplificación del plásmido pIRES2-Pck2PA.....	29
II. Cultivo de las células HEK-293T.....	29
III. Registro electrofisiológico.....	30
Resultados	32
I. Transfección de las células HEK-293T con el ADNc de Pck2PA insertado en el vector pIRES2-EGFP.	32
II. Caracterización de las relaciones corriente–voltaje en la configuración de célula completa de la subunidad Pck2PA.	33
III. Determinación de la identidad del canal expresado por la subunidad Pck2PA mediante la conductancia unitaria.	35

IV. Identificación de la sensibilidad a cambios en la temperatura de la corriente generada por el canal formado por la subunidad Pck2PA.....	37
Discusión	39
I. La sobre-expresión de la subunidad Pck2PA genera un aumento en la amplitud de la corriente de fuga.....	39
II. La expresión de Pck2PA genera dos corrientes con dos diferentes conductancias	41
III. La corriente de fuga generada por Pck2PA es sensible a cambios de temperatura	42
Conclusiones	43
Referencias.....	44

Resumen

Los canales de potasio son el grupo de canales iónicos más grande y heterogéneo. Estos canales son ubicuos y se agrupan, de acuerdo a la topología de las subunidades formadoras del poro, en tres familias: la primera con subunidades con seis dominios transmembranales (TM), la segunda con dos dominios TM y la tercera y menos estudiada, con cuatro dominios TM. Esta última familia conocida como canales de potasio con dos dominios de poro (K2P), además de las cuatro hélices transmembranales, presenta dos motivos de poro, dos hélices extracelulares y se dimerizan para formar un canal funcional. La principal función de los canales K2P es establecer el potencial de membrana en reposo. Dentro de los miembros de esta familia de canales existe una subfamilia sensible a cambios de temperatura denominada TREK (canales de K⁺ sensibles a lípidos relacionados con TWIK). Observaciones en nuestro laboratorio han sugerido la presencia de estos canales en el sistema neurosecretor órgano X–glándula sinusal del acocil *Procamabrus clarkii*, que regula la secreción de hormonas de importancia fisiológica para este organismo en respuesta a cambios en la temperatura. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue caracterizar electrofisiológicamente la proteína Pck2PA que potencialmente codifica para subunidades de canales de la subfamilia TREK clonada a partir del tallo ocular de *P. clarkii*. Utilizando la transfección de la proteína clonada en células HEK-293T y mediante dos protocolos electrofisiológicos, se determinaron los cambios en la corriente macroscópica de fuga y su dependencia a la temperatura, así como la conductancia unitaria de dicho canal. Los resultados nos permitieron observar que existe un aumento en la corriente de fuga de K⁺ a través de los canales formado por la proteína clonada debida a su sobre-expresión en células HEK-293T y, además, nos permitieron reconocer que dicha corriente de fuga es dependiente a los cambios en la temperatura con un Q₁₀ de 3.25. Por otra parte, el registro de corriente unitaria nos permitió reconocer dos comportamientos del canal formado con diferente valor de conductancia. El primero con eventos de apertura breves y en ráfagas con un valor de conductancia de 31.49 pS y el segundo con tiempos de apertura más largos y estables y con un valor de conductancia de 65.73 pS. Estos resultados sugieren que la proteína clonada del tallo ocular de *P. clarkii* pertenece a la subfamilia TREK y por sus características funcionales podría tratarse de un ortólogo del canal TREK-1 en el acocil.

Abstract

Potassium channels are the largest and most heterogeneous group of ion channels. These channels are ubiquitous and are grouped, according to the topology of the pore-forming subunits, into three families: the first with subunits with six transmembrane domains (TM), the second with two TM and the third and less studied with four TM. This last family known as potassium channels with two pore domains (K2P), in addition to the four transmembrane helices, has two pore motifs, two extracellular helices and dimerize to form a functional channel. The main function of the K2P channels is to establish the resting membrane potential. Within the members of this family of channels there is a subfamily sensitive to temperature changes called TREK (lipid-sensitive K⁺ channels related to TWIK). The study model of our laboratory has suggested the presence of these channels in the neurosecretory system organ X-sinus gland of the crayfish *Procamabrus clarkii*, which regulate the secretion of hormones of physiological importance for this organism in response to changes in temperature. Therefore, the objective of this work was to electrophysiologically characterize the protein that potentially encodes subunits of channels of the TREK subfamily cloned from the ocular stem of *P. clarkii*. Using the transfection of the cloned protein in HEK-293T cells and with two electrophysiological protocols to determine the changes in the macroscopic leak current and its temperature dependence. As well as, the unit conductance of said protein. The results allowed us to observe that there is an increase in the leak current of K⁺ through the channel formed by the cloned protein due to its overexpression in HEK-293T cells and, in addition, allowed us to recognize that said leak current is dependent on changes in temperature with a Q₁₀ of 3.25. On the other hand, the unit current register allowed us to recognize two behaviors of the channel formed with different conductance value, the first with short opening events and bursts with a lower conductance value (31.49 pS) and the second with longer and more stable openings with a major conductance (65.73 pS). These results suggest that the ocular stem protein cloned belongs to the TREK subfamily and could be the TREK-1 channel.

Introducción

I. Canales de potasio (K⁺)

Los canales de potasio (K⁺) son proteínas integrales de membrana que regulan el transporte del ion K⁺ a través de la membrana, juegan un papel crucial en todas las células y en todos los organismos. El movimiento pasivo de dicho ion determina el potencial de membrana en reposo y la fuerza impulsora la aporta el potencial de equilibrio del potasio (E_K). En células excitables la actividad de los canales de potasio siempre reduce la excitabilidad alejando el potencial de membrana del umbral de disparo (Kuang *et al.*, 2015; Hille, 2001). Además, estos canales mantienen breves los potenciales de acción, finalizan los periodos de actividad intensa y regulan los intervalos entre espigas durante el disparo repetitivo. También determinan los intervalos entre trenes de actividad en neuronas marcapaso, participan en la forma y la duración de los potenciales de acción, incluyendo la hiperpolarización post-potencial y la hiperpolarización post-ráfaga. Además, una estrategia fundamental que regula la excitabilidad es a través del cierre de los canales de K⁺ por sistemas de segundos mensajeros. En células gliales, los canales de K⁺ ayudan a amortiguar el exceso extracelular de iones de K⁺ para mantenerlo a concentraciones adecuadas cerca de las neuronas activas, mientras que el efecto de algunos tipos de anestésicos utilizados en la clínica depende de la apertura de dichos canales. El repertorio de funciones crece a medida que se describen más respuestas fisiológicas en diversos tipos celulares, por lo que quedan por descubrir más funciones para los canales de K⁺ (Hille, 2001; Nerbonne, 2016).

Actualmente, con más de 78 genes que codifican para subunidades formadoras de poro en el genoma humano, los canales de K⁺ son el grupo más diverso, heterogéneo y ubicuo de los canales iónicos (Coetzee *et al.*, 1999; Feliciangeli *et al.*, 2015).

A pesar de la gran diversidad de canales de potasio, mediante experimentos de clonación y de mutagénesis se ha reforzado la conclusión de que todos los canales permeables a K⁺ tienen la misma organización común básica que permite identificarlos. Sin excepción, la principal característica es su selectividad a los iones de potasio, misma que se encuentra asociada a un motivo altamente conservado con la secuencia Thr-X-Gly-Tyr-Gly, la cual ha sido llamada "secuencia firma" de los canales de K⁺. Si dicho motivo presenta una alteración en la secuencia de

aminoácidos, el canal pierde su capacidad para discriminar entre iones de K^+ y de Na^+ (Doyle *et al.*, 1998; Sansom *et al.*, 2002).

Esta secuencia “firma” se encuentra en el asa del poro flaqueada por dos hélices transmembranales necesarias para completar el núcleo formador del poro. Esta simple topología, denominada 2TM/P, es la arquitectura canónica de las subunidades formadoras de canales de K^+ y muy probablemente es la estructura más primitiva y mínima para formar un canal selectivo (Figura 1). Además, adicionada a esta arquitectura esencial, cada grupo de canales de K^+ presenta características adicionales y distintivas. Otra característica básica es que los canales de K^+ están formados por tetrámeros de subunidades idénticas o similares arregladas en una simetría cuádruple donde los cuatro dominios formadores de poro se requieren para formar al poro que es la vía de permeación de iones K^+ a través de la membrana (Figura 1) (Miller, 2000; Kuang, 2015).

La apertura de los canales de potasio permite a los cationes fluir pasivamente a través de la membrana de manera rápida y altamente selectiva, a una velocidad cercana a los límites de la difusión (10^7 iones-canal $^{-1}$ ·s $^{-1}$) (Hille, 2001; Choe, 2002; Nerbonne, 2016; Sansom *et al.*, 2002, Kuang, 2015).

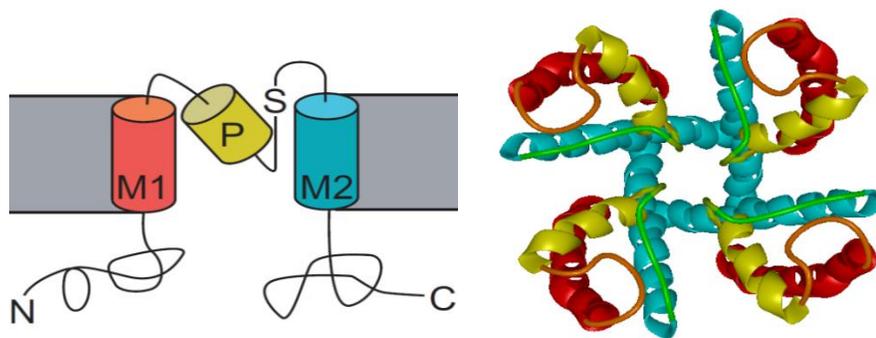


Figura 1. Topología general de un canal de potasio. (A) Topología transmembranal del canal de potasio (2TM/P); cada subunidad cuenta con dos dominios transmembranales (M1 y M2) con el dominio de poro (bucle) en medio (P) como una pequeña hélice, la cual contiene el motivo firma del filtro de selectividad (T-X-G-Y-G). La bicapa fosfolipídica está indicada con cuadros de color grises. (B) Vista intracelular del tetrámero de subunidades α formando un canal completo, el orificio central corresponde al poro. Tomada de Sansom *et al.*, 2002.

De la amplia gama de corrientes iónicas, las corrientes de K^+ son por mucho las más numerosas y diversas. Estas corrientes muestran distintas propiedades dependientes del voltaje y con diferentes sensibilidades farmacológicas. Además, existe diversidad en la topología que presenta la subunidad α formadora de canales de K^+ . Gracias a estas características se ha logrado la separación en grupos, así como la delimitación del impacto funcional de las propiedades biofísicas de diferentes tipos canales de K^+ en neuronas en reposo y activas (Figura 2) (Nerbonne, 2016).

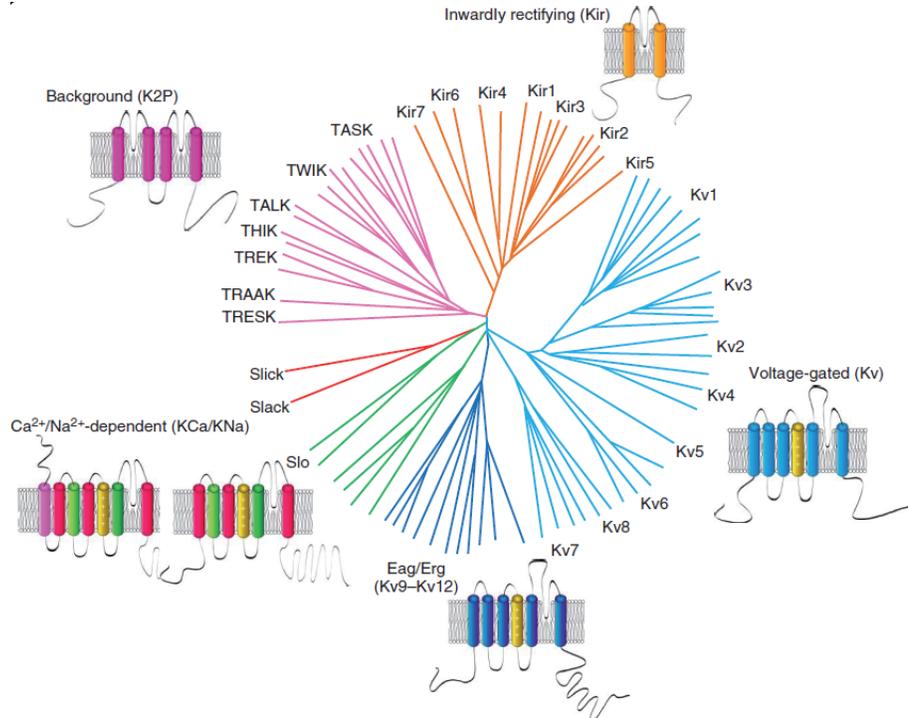


Figura 2. Árbol filogenético de las subunidades α formadoras de los canales de K^+ . Subunidades α de los canales activados por voltaje (Kv), dependientes de Ca^{2+} (KCa), dependientes de sodio (KNa), rectificadores entrantes (Kir) y con dos dominios de poro (K2P). Cada familia es mostrada con diferente color en el árbol, así como en sus segmentos transmembranales (Nerbonne, 2016).

Los canales de potasio tienen la propiedad de rectificación, que consiste en un flujo preferencial de la corriente en una dirección, ya sea por la concentración desigual de un ion en ambos lados de la membrana, la dependencia de un canal a ciertos rangos de potencial de membrana que favorece la salida o entrada de corriente, y finalmente por un bloqueo dependiente de voltaje (Goldstein *et al.*, 2001).

A continuación, se describirán brevemente las características de los principales grupos de canales de potasio. El primer grupo corresponde a la familia de canales de potasio Kir, que a diferencia del resto de canales de potasio presenta una rectificación

entrante, es decir conducen más iones de potasio hacia el interior que hacia el exterior de la célula. La conductancia máxima de estos canales ocurre a potenciales de membrana negativos y disminuye a potenciales cercanos al potencial de equilibrio del K^+ . La rectificación entrante durante la despolarización ocurre debido al bloqueo del poro de permeación, ya sea por Mg^{2+} intracelular o por poliaminas. Durante la repolarización, el bloqueo es removido permitiendo que los iones de K^+ entren a la célula. Además de esta característica, los canales Kir pueden ser clasificados en tres grupos funcionales: (1) canales Kir clásicos, (2) canales activados por proteínas G y fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2) y (3) canales de K^+ modulados por nucleótidos como ATP y ADP (Kuang *et al.*, 2015; González *et al.*, 2012). Los miembros de este grupo contienen subunidades α con dos hélices transmembranales que flanquean la región del filtro de selectividad a K^+ . Existen 15 diferentes genes distribuidos en 7 subfamilias de subunidades α (Kir1-Kir7). Todos los canales Kir clásicos se expresan en el sistema nervioso y su expresión en neuronas está restringida al soma y las dendritas, en donde son importantes para determinar el potencial de membrana en reposo y el control de la excitabilidad neuronal. Otros canales Kir se expresan en las células de Schwann, en donde mantienen constante la concentración externa de K^+ al amortiguar el exceso de este ion secretado por las neuronas durante la excitación, mientras que en células β del páncreas controlan la secreción de insulina. Además, en el riñón los canales Kir localizados en la membrana basolateral del túbulo colector cortical mantienen el potencial de membrana a valores suficientes para dirigir el flujo del K^+ de la cara basolateral a la cara apical (Kuang *et al.*, 2015; González *et al.*, 2012).

El segundo grupo corresponde a los canales de K^+ sensibles a voltaje (K_V). En general estos canales se abren cuando la membrana es despolarizada, permitiendo el eflujo de iones K^+ , y permanecen cerrados cuando la membrana se repolariza. Dichos canales se inactivan por dos mecanismos: uno rápido tipo N y otro lento o tipo C, llamados así por el extremo amino o carboxilo que se encuentre implicado, respectivamente. La inactivación tipo N se explica por el modelo de “bola y cadena”, donde los primeros 22 aminoácidos de la subunidad α forman una “partícula de inactivación”. En cambio, la inactivación tipo C se debe a cambios conformacionales en el filtro de selectividad inducidos por un aumento de la concentración extracelular de K^+ . Los canales K_V tienen seis hélices transmembranales, de las cuales las

primeras cuatro (TM1–TM4) forman el dominio del sensor de voltaje (VSD) y las últimas dos hélices (TM5–TM6) componen el dominio formador del poro, el cual muestra características estructurales conservadas con la topología 2TM/P. El VSD transduce los cambios del potencial de membrana provocando cambios conformacionales que generan la apertura del dominio formador del poro. En términos generales, las corrientes de K⁺ de esta familia de canales participan en la generación de potenciales de acción. Las subunidades de este gran grupo son codificadas por 36 genes y funcionalmente se pueden agrupar con base a su dependencia al voltaje (K_V), al calcio (K_{Ca}) o al sodio (K_{Na}) (Kuang *et al.*, 2015; González *et al.*, 2012).

El tercer grupo, conocido como canales de potasio con dominios de poro (K2P), se describe con detalle en el apartado siguiente, ya que son el tema central del presente proyecto.

II. Canales de potasio con dos dominios de poro K2P

Los canales de potasio K2P han sido nombrados así por codificar dos dominios de poro putativos, responsables de la selectividad a K⁺ dentro de la secuencia de aminoácidos de una sola subunidad proteica (Lotshaw, 2007). Este grupo de canales forman canales de potasio de fuga (también llamados de fondo) que son canales iónicos selectivos a K⁺ que están constitutivamente abiertos en el reposo y durante el disparo. Estos canales operan dentro de los rangos fisiológicos de voltaje y, por lo tanto, influyen tanto en eventos de excitabilidad —alterando la amplitud y la duración del potencial de acción en voltajes despolarizados— así como estableciendo el potencial de membrana en voltajes hiperpolarizantes por debajo del umbral de disparo de potenciales de acción. Por lo tanto, estos canales son centrales en el desarrollo y excitabilidad de muchos tipos celulares (Honoré, 2001; Feliciangeli *et al.*, 2015; Zheng y Trudeau, 2015).

El primer gen de mamífero identificado que codifica para estos canales se caracterizó en 1996 y fue nombrado TWIK-1, un acrónimo en inglés de “tándem de dominios de poro en un canal de K⁺ rectificador entrante débil” (“Tandem of P domains in Weak Inward rectifier K⁺ channel). Los nombres de los genes descubiertos subsecuentemente siguieron esta convención y se agruparon con base a similitudes funcionales y estructurales en sus secuencias, siendo 15 genes agrupados en seis

familias: TWIK, TREK, TASK, TALK, THIK y TRESK. Pese al bajo número de miembros, este agrupamiento es razonable debido a que la variación entre las secuencias de estas diferentes subunidades es tan grande como la que existe entre las familias de canales de K⁺ (Lotshaw, 2007; Enyedi y Czirják, 2010).

La diversidad de estos canales se ve incrementada en gran medida por el empalme (splicing) alternativo, el inicio de la traducción, la heterodimerización y las modificaciones post-traduccionales. Además, estos canales están regulados por un gran rango de estímulos físicos y químicos incluidos el pH, las señales lipídicas, la presión mecánica, el estiramiento de la membrana, las cinasas de proteínas, los ácidos grasos insaturados, los niveles de oxígeno y la temperatura. También son modulados por vías de segundos mensajeros que involucren receptores de membrana acoplados a proteínas G_q y G_s, además de ser blancos de drogas como anestésicos, agentes neuroprotectores y antidepresivos (Felicciangeli *et al.*, 2015; Vivier *et al.*, 2015; González *et al.*, 2012).

Pese a que los miembros de las diferentes subfamilias muestran baja similitud de secuencia entre ellos, todos se caracterizan por la misma arquitectura molecular general, la cual se a revisará a continuación (Enyedi y Czirják, 2010).

i. *Estructura de las subunidades formadoras de los canales K2P*

Las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de los genes de estos canales están en el rango de 300–500 residuos y todos exhiben una topología similar, presentando subunidades que están definidas por cuatro hélices transmembranales (TM1–TM4) y dos dominios de poro (P1 y P2). Asimismo, presentan un extremo amino terminal corto y un carboxilo terminal relativamente largo, localizándose ambos en el citoplasma (Figura 3) (Vivier *et al.*, 2015).

Usualmente las secuencias que conectan las hélices transmembranales son cortas, exceptuando la secuencia entre la hélice TM1 y la hélice TM2 con ~80 residuos que incluyen el primer dominio de poro. Esta secuencia contiene una región extracelular, donde usualmente se encuentran una o más asparaginas (Asn), que podrían ser sitios de *N*-glicosilación. Además, esta zona ha sido identificada como una región con importancia farmacológica. El segundo dominio de poro se encuentra entre las hélices TM3 y TM4. En algunas subfamilias de estos canales, se ha demostrado que el extremo carboxilo tiene un papel importante en la modulación de la activación del

canal (Lotshaw, 2007; Jezzi *et al.*, 2006; Vivier *et al.*, 2015; Christensen *et al.*, 2016; Brohawn *et al.*, 2012; González *et al.*, 2012).

Un canal K2P funcional está compuesto por el ensamble de dos subunidades α — formando canales homodiméricos y en algunos casos heterodiméricos— las cuales contribuyen con dos dominios de poro para formar el filtro de selectividad en concordancia con la organización estructural del resto de familias de canales de K^+ . Esta dimerización se ha atribuido al dominio extracelular entre la hélice TM1 y P1, que forma dos hélices (E1 y E2), y que se extiende sobre el vestíbulo del canal formando un dominio capucha. Además, la presencia de un residuo de cisteína (Cys) entre ambas hélices, que se encuentra en la punta del capuchón, contribuye a la dimerización debido a la formación de un enlace disulfuro que permite la estabilización de la estructura, aunque éste no es está presente en todos los miembros de esta familia (Lotshaw, 2007).

Dicho dominio capucha bifurca el acceso al poro para la conducción de K^+ , y explica por qué las neurotoxinas peptídicas fallan al bloquear el poro de los canales K2P debido al acceso limitado que éstas tendrían (Lotshaw, 2007; Feliciangeli *et al.*, 2015; Christensen *et al.*, 2016).

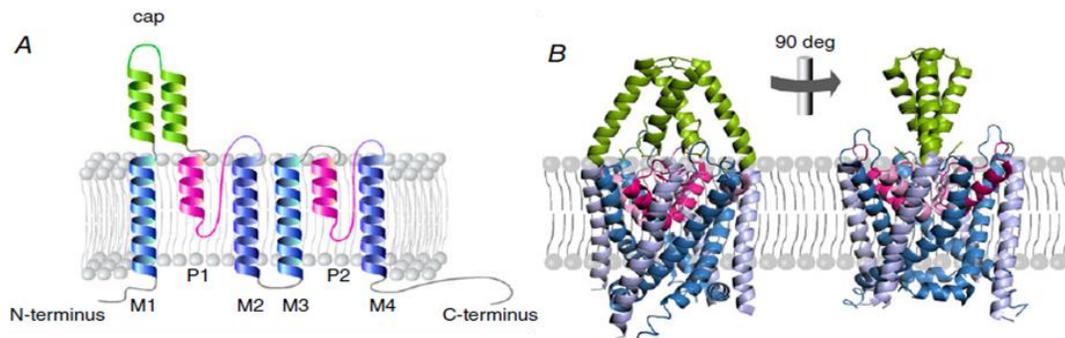


Figura 3. Estructura general de los canales K2P. (A) Representación esquemática de la topología de las subunidades formadoras de canales K2P. Se presentan los dominios característicos de la familia de canales K2P, un extremo N-terminal intracelular, los dominios formadores de poro (P1–2) (rosa), las cuatro hélices transmembranales (TM1–4) (azul), el dominio de capucha (E1–2) (verde) y el extremo C-terminal intracelular. (B) Estructura cuaternaria de un canal K2P, donde se encuentran dos subunidades juntas formando un homodímero que genera un canal funcional. Tomada de Feliciangeli *et al.*, 2015.

ii. *Características biofísicas y farmacológicas de los canales K2P*

A pesar de que la topología de las subunidades formadoras de canal es única, los canales K2P conducen el K^+ de manera muy similar a otras clases de canales selectivos a este ion (Lotshaw, 2007).

Aun cuando las neuronas permanecen eléctricamente silentes, el potencial de membrana (E_m) nunca está en verdadero reposo ya que existen proteínas de transporte activo electrogénicas y corrientes de fuga. Es bien aceptado que los canales K2P dan origen a las corrientes de fuga de K^+ , y debido a que permanecen abiertos durante el disparo de potenciales de acción, permiten la recuperación del potencial reposo al mantener el eflujo de K^+ constante (Zheng y Trudeau, 2015). Teniendo en cuenta que el E_m de una célula es la suma de los potenciales de equilibrio para los iones que son relativamente permeables a la membrana celular, y sabiendo que existen corrientes de fuga considerables a través de los canales K2P, el E_m en reposo es muy cercano al potencial de equilibrio de potasio (E_K). Ello permite la estabilización de la célula en potenciales hiperpolarizantes, por debajo del umbral de disparo del potencial de acción (Brohawn *et al.*, 2012; Enyedi y Czirják, 2010).

De esta manera, un estímulo que aumente la amplitud de la corriente de fuga de K^+ disminuye la excitabilidad debido a que el potencial de membrana se acerca aún más al E_K , requiriéndose un estímulo despolarizante de mayor intensidad para iniciar un potencial de acción. En el caso contrario, una inhibición de la corriente de fuga de K^+ favorece la despolarización del E_m , por lo que un estímulo más pequeño es capaz de disparar el potencial de acción. Por consiguiente, la corriente de fuga debida a canales K2P no sólo regula la magnitud requerida para iniciar un potencial de acción, sino que además modifica la forma, frecuencia y magnitud de cada espiga (Hille, 2001).

Los canales K2P (KCNK) muestran un comportamiento llamado rectificación de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK), o rectificación abierta, y sus propiedades de permeabilidad se aproximan a la predicción de la ecuación de corriente en campo constante para la libre difusión de iones a través de un poro selectivo a ion abierto (Figura 4) (Goldstein, 2001).

En otras palabras, las corrientes a través de los canales K2P cambian de manera lineal en función del voltaje cuando las concentraciones de K^+ presentan una distribución simétrica de K^+ , es decir, a concentraciones iguales del ion a ambos lados

de la membrana. Esto significa que la pendiente de la conductancia entrante es igual en comparación con la pendiente de la conductancia saliente, generando una relación I–V lineal, sin una rectificación, y que cruza a 0 mV. Sin embargo, cuando la concentración del ion es alta al interior de la célula y baja al exterior (como ocurre fisiológicamente: 140 mM de K⁺ intracelular y 5 mM de K⁺ extracelular) se observa una gran corriente saliente, por lo que la pendiente de la conductancia entrante es pequeña en comparación con la pendiente de la conductancia saliente. Lo anterior provoca una pequeña rectificación, con una inflexión de la curva I–V en el valor del potencial de equilibrio de K⁺ predicho por la ecuación de Nernst (cerca de –90 mV); es decir, los canales conducen menos corriente entrante (Goldstein, 2001; Lotshaw, 2007; Enyedi y Czirják, 2010).

La corriente de fuga de potasio que fluye por los canales K2P no es dependiente del voltaje, debido a que estos canales no tienen un dominio sensor de voltaje, y por lo tanto no son activados por el potencial de membrana. Además, carecen de mecanismos de inactivación dependientes del tiempo, ya que muestran ráfagas de actividad que duran algunos minutos a cualquier valor de voltaje, y tanto la apertura como el cierre de los canales son instantáneos (Enyedi y Czirják, 2010; Goldstein *et al.*, 2001; Feliciangeli *et al.*, 2015).

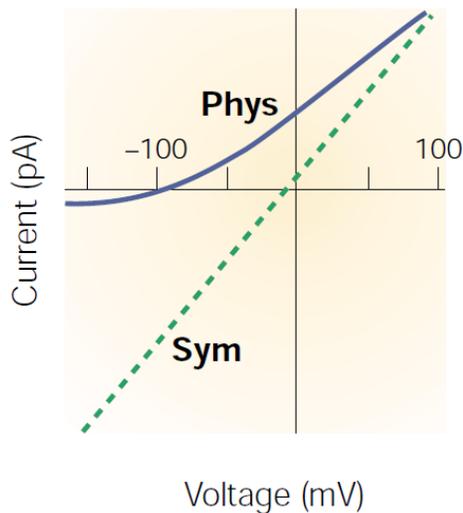


Figura 4. Relación corriente-voltaje para canales K2P. Se muestra las curvas I–V calculadas con la ecuación de corriente en campo constante bajo condiciones de alto K⁺ interno y bajo K⁺ externo mostrando un comportamiento rectificador saliente (línea sólida) y en condiciones equimolares de K⁺ mostrando un comportamiento rectificador abierto (línea punteada). Tomada de Goldstein *et al.*, 2001.

En sistemas heterólogos, se ha encontrado que los canales K2P clonados producen corrientes de fuga de K⁺ similares a las corrientes nativas previamente identificadas en células cardiacas y nerviosas (Feliciangeli *et al.*, 2015).

Aunque se espera este comportamiento de fuga previamente descrito para todos los canales K2P, definir a los canales K2P solamente como rectificadores abiertos no es tan preciso debido a que algunas subunidades o isoformas tienen, además, su propio comportamiento, observándose relaciones corriente–voltaje con un comportamiento rectificador entrante o rectificador saliente (Goldstein, 2001; Feliciangeli *et al.*, 2015).

Así mismo, es sabido que los canales K2P son insensibles a los bloqueadores clásicos de canales de K⁺ como el tetraetilamonio (TEA), la 4-aminopiridina (4-AP) y el Cs⁺. En general los canales K2P exhiben un bloqueo con Ba²⁺ dependiente de voltaje, además de una inhibición por anestésicos locales (bupivacaina, quinidina y quinina) y por el mibefradil. Estas drogas no selectivas han sido utilizadas para identificar tentativamente las corrientes de los canales K2P nativos (Lotshaw, 2007; Feliciangeli *et al.*, 2015).

La falta de información sobre la farmacología, así como la independencia del tiempo y voltaje, explica por qué estas corrientes se han pasado por alto, a pesar de su presencia en muchos tejidos y células. Ello ha obstaculizado la caracterización de los canales K2P a pesar de su importante papel en la regulación de la excitabilidad celular. A pesar de que estos canales se comportan como canales de fuga, están regulados finamente por muchos estímulos diferentes, y estas regulaciones han demostrado ser muy útiles para correlacionar los canales clonados con los nativos (Feliciangeli *et al.*, 2015).

La regulación de la apertura o cierre de los canales K2P por diferentes estímulos ha ayudado a su clasificación. Los 15 genes que forman esta familia de canales se han subdividido en seis subfamilias, las cuales se describirán brevemente a continuación.

iii. Subfamilias de los canales K2P

La nomenclatura de estos canales en la literatura sigue siendo una mezcla de los nombres comunes y los nombres de la IUPHAR (International Union of Basic and Clinical Pharmacology). Así, basados en sus características funcionales y estructurales, los canales K2P pueden ser divididos en 6 subfamilias (Figura 5) (Christensen *et al.*, 2016; Doring *et al.*, 2006)

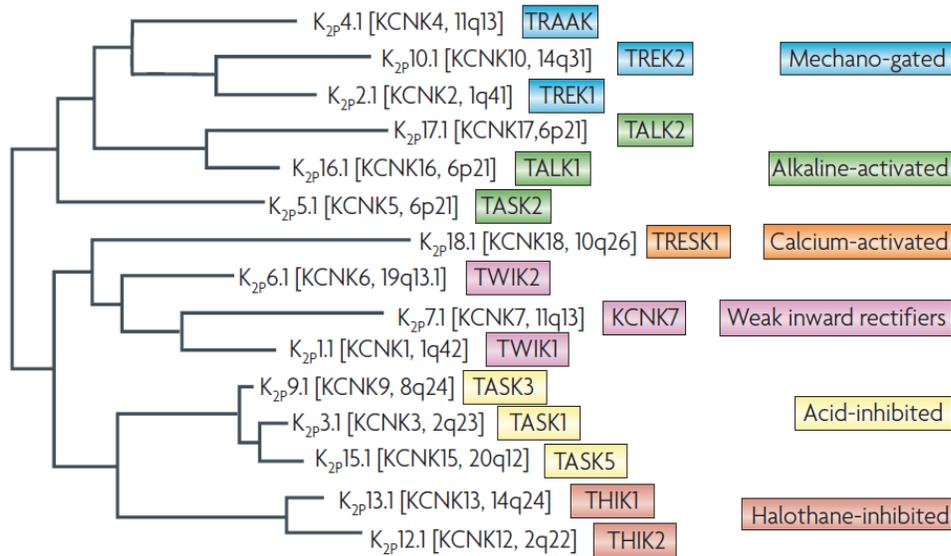


Figura. 5. Dendrograma de la familia de canales de potasio de dos dominios de poro (K2P). Nomenclatura de las subfamilias de canales K2P con la localización cromosómica y el principal regulador de la característica funcional de cada subunidad. Los seis subgrupos funcionales y estructurales están identificadas por diferentes colores. De izquierda a derecha se presentan primero los nombres usados para canales con dos dominios de poro K2P de acuerdo a la nomenclatura IUPHAR, posteriormente se observan los nombres con HUGO de cada gen según la *Human Genome Organization*. A continuación, se encuentra la localización cromosómica de los genes K2P, y finalmente los nombres comunes de acuerdo con las características biofísicas

1) TWIK, canales rectificadores entrantes débiles de K⁺

La subfamilia TWIK incluye el primer miembro de la familia de los canales K2P en ser descubierto: TWIK-1 (KNCK1, K2P1) y también a las subunidades TWIK-2 (KCNK6, K2P6) y la subunidad silente KCNK7 (K2P7) (Lotshaw, 2007; Enyedi y Czirják, 2010).

El ARNm de TWIK-1 está altamente expresado en tejidos como pulmones, placenta, riñones, sistema nervioso central y músculo cardíaco, tanto en humano como en ratón. TWIK-2 también presenta una alta expresión en tejidos tanto en humano como en ratón, a excepción del cerebro, donde existe una notable ausencia en ambas especies. En cambio, KCNK7 está ausente en tejidos humanos (Christensen *et al.*, 2016; Lotshaw, 2007; Enyedi y Czirják, 2010).

Se ha reportado que tanto TWIK-1 como TWIK-2 presentan una corriente de K⁺ con una rectificación entrante débil, una cinética instantánea y ausencia de inactivación en respuesta a pequeños cambios en el voltaje. Estas características se han observado en canales expresados en ovocitos de la rana *Xenopus laevis* en

condiciones simétricas del ion, y en las mismas condiciones TWIK-1 tiene una conductancia de canal unitario de 34 pS a -80 mV, mientras que para TWIK-2 es < 5 pS (Lotshaw, 2007; Enyedi y Czirják, 2010).

Uno de los mecanismos reguladores de este canal es su silenciamiento por la proteína SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) debido a una modificación covalente reversible en la Lys²⁷⁴; la deSUMOilación por proteasas específicas, o una mutación en la Lys²⁷⁴, pueden activar al canal permitiendo su apertura (Christensen *et al.*, 2016; Zheng y Trudeau, 2015).

Esta familia de canales también presenta una inhibición por pH ácido en el medio extracelular y es sensible a concentraciones de K⁺ externas (pH 6.7 y 4 mM K⁺). La fosforilación por la cinasa de proteínas C incrementa su actividad y la proteína G acoplada al receptor de serotonina 5-HT1R también los activa. Las corrientes de fuga de estos canales determinan el E_m en neuronas granulares cerebelares y responden a cambios en el pH, la pO₂ y los anestésicos volátiles (Christensen *et al.*, 2016; Zheng y Trudeau, 2015).

2) TASK, canales de K⁺ sensibles a pH ácido relacionados con TWIK

El segundo grupo de esta familia está formado por canales en los cuales la corriente de fuga de K⁺ es bloqueada por la protonación de un residuo de His extracelular (His⁹⁸) en la boca externa del poro en humanos. Este grupo está formado por TASK-1 (KCNK3, K2P3), TASK-3 (KCNK9, K2P9) y TASK-5 (KCNK15, K2P15). TASK-1 y TASK-3 están muy relacionados a nivel molecular, compartiendo 58% de identidad a nivel de aminoácidos; las subunidades α de dichos canales son las únicas subunidades que se ha reportado forman canales heterodiméricos funcionales en la familia K2P con propiedades distintas a los homodímeros formados por esta subfamilia (Lotshaw, 2007; Enyedi y Czirják, 2010).

Se presentan en el SNC, en el SNP, en riñón, en músculo cardíaco, páncreas, placenta, hígado y en células glomerulares adrenales (Doring, 2006; Zheng y Trudeau, 2015; Lotshaw, 2007)

La expresión heteróloga de TASK-1 y TASK-3 en líneas celulares de mamíferos o en ovocitos de *X. laevis* produce corrientes robustas de K⁺. TASK-1 exhibe una rectificación abierta siguiendo las predicciones de la ecuación GHK en condiciones

fisiológicas de K^+ , y una relación I–V lineal con rectificación abierta en condiciones simétricas del ion. Además, sus corrientes son descritas como independientes del voltaje y del tiempo (Lotshaw, 2007; Enyedi y Czirják, 2010). Las conductancias unitarias son de 14 pS y 30 pS para TASK-1 y TASK-3, respectivamente. Los cambios en la magnitud de las corrientes de fuga en respuesta a la acidificación están correlacionadas con la cinética lenta de la despolarización en neuronas somatosensoriales que expresan estos canales (Doring et al., 2006; Lotshaw, 2007).

3) TALK, canales de K^+ activados por pH alcalino relacionados con TWIK

Este grupo de canales de K^+ es sensible a pH alcalino extracelular (> 7.5) y está formado por las subunidades TALK-1 (KCNK16, K2P16), TALK-2 (KCNK17, K2P17) y TASK-2 (KCNK5, K2P5). Este último fue incluido en la familia de los canales sensibles al pH ácido hasta que se descubrió que su rango de sensibilidad es alcalino. Se encuentran en riñón e hígado y se ha detectado poca expresión en el sistema nervioso. Además, su alta expresión en el páncreas sugiere la contribución de estos canales al mecanismo secretor exocrino y facilitan la secreción de bicarbonato desde las células epiteliales del páncreas (Lotshaw, 2007; Enyedi y Czirják, 2010).

En general, la sensibilidad al pH alcalino se debe a los residuos básicos (Arg o Lys) cercanos al segundo dominio de poro que afectan las propiedades del filtro de selectividad. Las corrientes macroscópicas de los canales TALK son similares a los otros miembros de los canales K2P, muestran una relación I–V con rectificación saliente no inactivante bajo concentraciones fisiológicas de K^+ , la cual se vuelve lineal bajo concentraciones simétricas del ion. La conductancia unitaria de estos canales es de 21 pS para TALK-1, de 33 pS para TALK-2 y de 50–60 pS para TASK-2 (Lotshaw, 2007; Enyedi y Czirják, 2010).

4) THIK, canales de K^+ inhibidos por halotano

Este grupo corresponde a canales de K^+ inhibidos por halotano en contraste al resto de canales K2P que en general son activados por dicho anestésico volátil (K_d 2.8 mM). La modulación por halotano bloquea la corriente de potasio de fuga. Este grupo de canales también presentan una débil inhibición por hipoxia (10% de inhibición por 20 mmHg pO_2). La subfamilia THIK se compone por los canales THIK-1 (KCNK13, K2P13) y THIK-2 (KCNK12, K2P12), los cuales presentan 63% de identidad entre sus secuencias. En mamíferos se expresan en corazón, músculo esquelético, páncreas y

riñón, así como en el núcleo retrotrapezoide en el SNC, donde al ser inhibidos disminuyen la conductancia en las neuronas quimiorreceptoras del sistema respiratorio central de este núcleo para preservar la respiración adecuada durante la anestesia (Jezzini *et al.*, 2006; Zheng y Trudeau, 2015).

La expresión heteróloga de THIK-1 produce una corriente de fuga de K^+ la cual es activada instantáneamente y no presenta inactivación a diferentes valores de voltaje. En condiciones fisiológicas de K^+ esta canal presenta una rectificación saliente. En cambio, en soluciones simétricas para K^+ la corriente de fuga presenta una débil rectificación entrante. Hasta la fecha no se han descrito las corrientes unitarias de esta familia (Lotshaw, 2007; Enyedi y Czirják, 2010).

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

El último grupo corresponde a los canales de K^+ de la médula espinal, cuya su función, al igual que la del resto, es permitir el paso a las corrientes de fuga de K^+ . Este grupo está conformado por el canal TRESK-1 (KCNK18, K2P18). Los canales clonados presentan una corriente que es sensible a un aumento intracelular de Ca^{2+} y tienen alta sensibilidad a anestésicos volátiles. Además, presentan una rectificación saliente en condiciones fisiológicas de K^+ , la cual se vuelve más lineal ante un aumento en la concentración externa del ion, pero mantiene su comportamiento de rectificador saliente aún bajo una distribución simétrica de K^+ . La conductancia del canal TRESK de ratón es de 13 pS en condiciones simétricas (Lotshaw, 2007; Enyedi y Czirják, 2010).

En roedores, los canales TRESK son sensibles a la acidificación del medio extracelular debido a la protonación en un residuo de histidina cercano al dominio de poro, pero en humano este residuo es sustituido por una Tyr lo que vuelve al canal insensible al pH ácido (Zheng y Trudeau, 2015).

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

III. Subfamilia TREK, los integradores de estímulos

La subfamilia TREK, nombrada por ser canales de K⁺ sensibles a lípidos relacionados con TWIK, son mejor conocidos por ser canales de K⁺ de fuga que exhiben una baja probabilidad de apertura con una débil dependencia al voltaje. Estos canales son fuertemente modulados por estímulos químicos y físicos, por lo que son importantes integradores de estímulos. El primer miembro de esta subfamilia en ser descubierto fue TREK-1 (KCNK2, K2P2) en 1996. Subsecuentemente se clonaron las subunidades TRAAK (canal de K⁺ activado por ácido araquidónico y relacionado con TWIK) (KCNK4, K2P4) y TREK-2 (KCNK10, K2P10) completando esta subfamilia. Existen variantes de estos canales con diferencias en el extremo amino terminal debidas al procesamiento alternativo para las tres subunidades, aumentando la diversidad de este grupo. Estas variantes se expresan en diferentes tejidos específicos presentando características biofísicas y farmacológicas distintivas (Lotshaw, 2007; Enyedi y Czirják, 2010). Esta subfamilia destaca no sólo por su papel en el mantenimiento del potencial de membrana en reposo y por controlar la excitabilidad, sino también por contribuir a la regulación metabólica y a la transducción de una diversidad de procesos sensoriales como mecanosensibilidad, termosensibilidad, quimiosensibilidad, nocicepción y neuroprotección. Además, los canales TREK han sido identificados como blancos farmacológicos importantes para la anestesia y potencialmente para el tratamiento de la depresión (Lotshaw, 2007; Enyedi y Czirják, 2010).

Los canales de la subfamilia TREK han sido involucrados en una gran variedad de procesos fisiopatológicos gracias a la utilización de modelos de ratones con estos genes eliminados (ratones “*knock-out*,” *TREK*^{-/-}), en donde se ha detectado que estas variantes de ratones son saludables, fértiles y no presentan anomalías morfológicas visibles. Sin embargo, estos estudios han indicado un rol central de estos canales en la anestesia, neuroprotección, percepción del dolor y depresión (Honoré, 2001).

En el caso de la anestesia, la apertura de esta subfamilia de canales por anestésicos volátiles induce hiperpolarización de las células. Los ratones *TREK*^{-/-} muestran un marcado decremento en la sensibilidad a cloroformo y halotano, demostrando que la apertura de canales TREK, aunado a la modulación de otros receptores blanco, contribuye al mecanismo de la anestesia general. También se ha demostrado que el canal TREK-1 es resistente a la hipoxia y se encuentra abierto durante la isquemia

química. Los ratones *TREK^{-/-}* son más sensibles a la isquemia y a la epilepsia que los ratones no modificados. Siendo los ácidos grasos polinsaturados, administrados intraventricular e intravenosamente, neuroprotectores contra la isquemia. Dicha neuroprotección está ausente en ratones *TREK^{-/-}*, indicando que la protección por ácidos grasos polinsaturados está mediada por la apertura de canales TREK-1. Además, se ha detectado la presencia de canales de la subfamilia TREK en la raíz del ganglio dorsal y que dichos canales pueden ser abiertos por estímulos nociceptivos como presión y calor. Los ratones *TREK^{-/-}* son más sensibles que los ratones no modificados al dolor producido por alguno de estos estímulos (Honoré, 2001).

Estos son algunos ejemplos del papel funcional de los canales de la subfamilia TREK en procesos de gran importancia para los organismos.

i. Patrón de expresión de la subfamilia TREK

En humano los canales TREK están altamente expresados en el sistema nervioso central, con abundante expresión en el cerebro y en la médula espinal, son particularmente abundantes en interneuronas GABAérgicas del núcleo caudado y del putamen. También se expresan en la corteza prefrontal, el hipocampo, el hipotálamo, la amígdala, los ganglios basales, la corteza, las neuronas serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafé en el mesencéfalo y las neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal. Además, han sido localizados en tejidos periféricos como en el tracto gastrointestinal, el corazón, los riñones, los ovarios, el intestino delgado y la arteria mesentérica, así como en los miocitos y células epiteliales. Su expresión es débil en el miometrio, la piel, los músculos y la próstata. En ratones, los canales TREK están expresados en las arterias cutáneas, en el endotelio de la red de vasos sanguíneos que rodean los folículos pilosos (Dedman *et al.*, 2009; Vivier *et al.*, 2015).

ii. Características electrofisiológicas y dependencia al voltaje

Tanto las corrientes macroscópicas como las corrientes unitarias de los canales TREK proporcionan criterios útiles para distinguir las isoformas de la subfamilia entre sí y entre otros canales K₂P.

TREK-1 ha sido descrito como un rectificador abierto, sin embargo, su relación I–V macroscópica muestra una rectificación saliente bajo condiciones simétricas de K⁺ en todos los ortólogos de especies y sistemas de expresión empleados. Esta rectificación

saliente ha sido atribuida tanto a un bloqueo de Mg^{2+} extracelular dependiente de voltaje de la corriente entrante, como a una débil dependencia al voltaje en la apertura del canal (Lotshaw, 2007)

Esta activación y desactivación dependiente de voltaje es evidente en las corrientes macroscópicas con pasos de voltaje en células COS transfectadas con TREK-1 de ratón. La presencia de este componente dependiente de tiempo en la corriente saliente macroscópica en respuesta a una despolarización por pasos de voltaje, sugiere que la apertura del canal es dependiente de voltaje. En el canal TREK de rata, esta activación dependiente de voltaje se ha relacionado con la fosforilación por la cinasa de proteína A (PKA) en la Ser³³³, en el extremo carboxilo de la proteína, interconvirtiendo al canal con características de fuga (con una respuesta instantánea) a un canal dependiente de voltaje con rectificación saliente (con una respuesta retardada) (Dedman *et al.*, 2009)

Una característica para identificar los canales TREK clonados es su gran conductancia unitaria, que es sustancialmente mayor que la de otros canales K₂P. Sin embargo, dentro de la subfamilia TREK las isoformas presentan diferencias entre sus relaciones I–V unitarias, las cuales son en gran medida consistentes con las características de la corriente macroscópica. La relación I–V de canal unitario de TREK-1 muestra una rectificación saliente en condiciones de K⁺ simétrico con conductancias salientes de 84–116 pS en presencia de 1–3 mM de Mg^{2+} extracelular. En cambio, una relación I–V lineal se obtiene con 1 mM de Mg^{2+} extracelular. Esta rectificación saliente se atribuye a la inhibición de la corriente saliente por el Mg^{2+} extracelular, y su ausencia incrementa la conductancia unitaria entrante hasta igualar o exceder la conductancia saliente. Por otra parte, la transfección de TREK-1 en células HEK producen dos poblaciones de canales que difieren en sus conductancias de canal unitario, una con 40 pS y la otra con 100 pS en condiciones simétricas de K⁺ (Lotshaw, 2007; Honore, 2001)

La actividad de canal unitario tiene un comportamiento de ráfaga característico. Además, a potenciales positivos de membrana la P_o del canal puede ser alta, cercana a un valor de 0.6; en contraste, a potenciales negativos la P_o del canal es mucho menor y la actividad de ráfaga desaparece (Enyedi y Czirják, 2010).

La corriente macroscópica de TREK-2 es similar a lo reportado para TREK-1, es decir, presenta una rectificación saliente en la relación I–V en K⁺ simétrico, atribuida a una dependencia de voltaje en la apertura del canal y a un bloqueo de la corriente entrante por el Mg²⁺ y el Ca²⁺ extracelulares. Se pueden distinguir los canales TREK-2 y TREK-1 gracias a sus características de canal unitario. En el humano y la rata, la relación I–V de canal unitario TREK-2 muestra una rectificación entrante en condiciones de K⁺ simétrico, calculándose una conductancia entrante en el rango de 104–179 pS en presencia de 1–3 mM de Mg²⁺ extracelular. Al remover el Mg²⁺ y el Ca²⁺ extracelulares la conductancia unitaria entrante aumenta al doble, sin afectar la conductancia saliente (Lotshaw, 2007).

Por otra parte, la relación I–V macroscópica del canal TRAAK clonado presenta una rectificación abierta en condiciones de K⁺ simétrico, diferenciándolo de los otros miembros de la subfamilia, aunque presenta pequeñas desviaciones de la predicción GHK en potenciales despolarizantes, posiblemente por una modulación dependiente de voltaje de la apertura del canal. Otra diferencia con los otros miembros de la subfamilia es la ausencia de efectos en presencia de Mg²⁺ o del Ca²⁺ extracelulares tanto en corrientes macroscópicas como en las unitarias. La conductancia unitaria de TRAAK en condiciones de K⁺ simétrico es de 45–110 pS (Lotshaw, 2007; Enyedi y Czirják, 2010).

iii. Modulación de la subfamilia TREK

La subfamilia de canales TREK presenta propiedades de regulación complejas, debido a que son modulados por varios estímulos, incluidos los mecánicos, la temperatura y el pH intracelular. También pueden ser modulados por ácidos grasos polinsaturados, como el ácido araquidónico, los fosfolípidos, como el fosfatidilinositol, la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilserina, entre otros. Además, estos canales son regulados por varios receptores y vías que involucran segundos mensajeros, como receptores de membrana acoplados a proteínas G_s y G_q. Pueden también ser fosforilados por cinasas de proteínas como la PKA y la PKC, la vía de activación del receptor a serotonina 5-HT₄, los receptores a glutamato mGluR₁ y mGluR₅, entre muchos otros estímulos (Vivier *et al.*, 2015). A continuación, se describe brevemente cómo algunos de estos estímulos afectan los miembros de esta subfamilia, principalmente los canales TREK-1, que es el miembro más estudiado.

Activación mecánica. Varios estudios han mostrado que el estiramiento de la membrana induce apertura del canal TREK-1 de manera reversible. La aplicación de presión negativa es más efectiva que la aplicación de presión positiva para abrir el canal, indicando que una curvatura convexa es la deformación de la membrana preferencial para activar el canal. La relación entre la actividad del canal y la presión es sigmoidal, teniendo la mitad de la máxima actividad cercana a los -50 mmHg. En registros de célula completa con solución externa hiperosmótica, la amplitud de la corriente de TREK-1 se reduce marcadamente, lo que sugiere que el volumen celular también afecta la actividad del canal, probablemente por la tensión de la membrana plasmática. Este canal también muestra una alta desensibilización a los 100 ms de estiramiento de la membrana (Honore, 2001; Maingret *et al.*, 1999; Patel *et al.*, 1999).

Sensibilidad al pH intracelular. Un pH interno ácido convierte a los canales TREK-1 y TREK-2 en canales de K^+ de fuga abierto constitutivamente, siendo el Glu 306 y 333 para TREK-1 y TREK-2, respectivamente, el residuo que actúa como sensor del pH. El canal TRAAK no es influenciado por la acidificación, pero si es afectado por la alcalinización del interior de la célula (Honore, 2001; Enyedi y Czirájk, 2010).

Termosensibilidad. Se ha demostrado que cuando TREK-1 se expresa en ovocitos de *Xenopus* y en células COS se activa gradualmente y de manera reversible, siendo el candidato que percibe la temperatura en las neuronas sensoriales de la raíz del ganglio dorsal. La apertura de TREK-1 a temperaturas elevadas contribuye a reducir el disparo de los potenciales de acción; en contraste, a temperaturas bajas se cierra el canal permitiendo la despolarización y el disparo de potenciales de acción. Las temperaturas a la que TREK-1 presenta sensibilidad es entre 32 y 37 °C, con un incremento de 0.9 veces en la amplitud de la corriente por grado centígrado, teniendo un valor de Q_{10} cercano a 9 (Maingret *et al.*, 2000).

Por otra parte, las sensibilidades térmicas de TREK-2 y TRAAK son muy similares a la presentada por TREK-1, los cuales también han sido estudiados en ovocitos de *Xenopus* y en células COS en un rango de 24 – 42 °C, presentando una corriente basal pequeña a temperatura ambiente e incrementado dicha corriente inducida por calor de manera independiente de voltaje. Dentro del rango de temperatura de 24 – 37 °C existe un incremento de 14 veces en la actividad del canal por cada 10 °C ($Q_{10} = 14$), indicando la alta sensibilidad a la temperatura del canal TREK-2. Dicho aumento de

actividad es revertido rápidamente cuando la temperatura baja. De igual manera, TRAAK es activado por temperaturas que van de 24–42 °C (Kang *et al.*, 2005).

En resumen, los tres miembros de la subfamilia TREK son sensibles a la temperatura, siendo activados en los rangos altos. No obstante, se ha sugerido que el sensor de temperatura puede ser una molécula estrechamente asociada a los canales, aunque si esto es cierto la molécula en cuestión aún no ha sido todavía identificada (Maingret *et al.*, 2000).

IV. Sistema órgano X - glándula sinusal

Para estudiar los canales K₂P y comprender mejor su características electrofisiológicas y farmacológicas se utilizó como modelo al acocil *Procambarus clarkii*. En este organismo existe evidencia de la presencia de estos canales que se describirá brevemente en la siguiente sección. *P. clarkii* es un crustáceo de agua dulce, es de larga vida, actúa como omnívoro politrófico y altera las redes tróficas de los hábitats que invade. Presenta gran plasticidad ecológica, tolerancia a un amplio rango de condiciones físicas, químicas y biológicas, adaptabilidad para cambiar de ambiente y alta fecundidad (Momot, 1995; Elio *et al.*, 2005; Manfrin *et al.*, 2014). El acocil *P. clarkii* es nativo del sur de los Estados Unidos de América y el norte de México (Palma, 2012).

El tallo ocular localizado en los pedúnculos oculares de dicho organismo es un órgano que contiene los quiasmas ópticos de la vía visual, así como otras estructuras asociadas a las funciones neuroendocrinas, tales como el órgano Y, localizado entre la lámina ganglionar y la médula externa. El sistema órgano X-glándula sinusal (OX-GS) es la estructura neurosecretora más importante en los crustáceos, constituida por cerca de 120 neuronas monopolares cuyos somas se localiza en la médula terminal y constituyen el OX. Los axones del OX se empaquetan para formar un tracto cuyos axones terminales arborizan de manera muy profusa y entran en asociación con un seno venoso para forma un órgano neurohemal (GS), que se localiza entre las médulas interna y externa (ver Figura 5). La GS sirve como sitio de almacenamiento y liberación de neurohormonas a la circulación. A nivel de la neuropila de la médula terminal las neuronas del OX reciben aferencias sinápticas que regulan su actividad eléctrica y por consecuencia su actividad secretora (García & Aréchiga, 1998).

P. clarkii presenta una preferencia térmica a temperaturas cercanas a 22 °C, si se le permite seleccionar la temperatura de su agrado, y se ha reportado que el estrés térmico induce un incremento en los niveles hemolinfáticos de la hormona hiperglicemiante de crustáceos, sugiriendo que este sistema neuroendocrino presenta una respuesta adaptativa a cambios en la temperatura (Zou *et al.*, 2003). Se ha descrito que esta hormona interviene en procesos fisiológicos como la muda, el crecimiento, la osmorregulación, la madurez sexual, la regulación del metabolismo, las respuestas a estímulos ambientales, la regulación de niveles de glucosa en la hemolinfa y la regulación del ritmo circadiano del animal (Manfrin *et al.*, 2014; Fanjul, 1998).

Las neuronas del OX presentan propiedades electrofisiológicas complejas. Se trata de neuronas marcapaso que pueden cambiar su patrón de disparo en un ciclo de 24 h, lo que requiere de un amplio repertorio de conductancias iónicas. Hasta la fecha se han descrito: una corriente de sodio sensible a tetrodotoxina, una corriente de calcio tipo P sensible a la ω -agatoxina IVA, una corriente de potasio del tipo rectificador retardado sensible a TEA, dos corrientes de potasio del tipo IA sensibles a distintas concentraciones de 4-aminopiridina (4-AP), una corriente transitoria de potasio dependiente de sodio y una corriente de potasio dependiente de calcio (Onetti *et al.*, 1990; Martínez *et al.*, 1991; García-Colunga y García, 1999; Alvarado-Álvarez *et al.*, 2000). Recientemente en nuestro laboratorio se demostró la presencia de canales de potasio del tipo rectificador entrante en neuronas del OX así como de canales K2P (García *et al.*, 2012; García y Fiorentino, 2018).

Otra característica importante del sistema OX-GS es que las neuronas establecen acople eléctrico y metabólico en poblaciones productoras de una hormona común. Dichas uniones se establecen en las arborizaciones de la neuropila de la médula terminal, lo que hace posible una amplificación de la respuesta neurosecretora (Alvarado-Álvarez *et al.*, 1993).

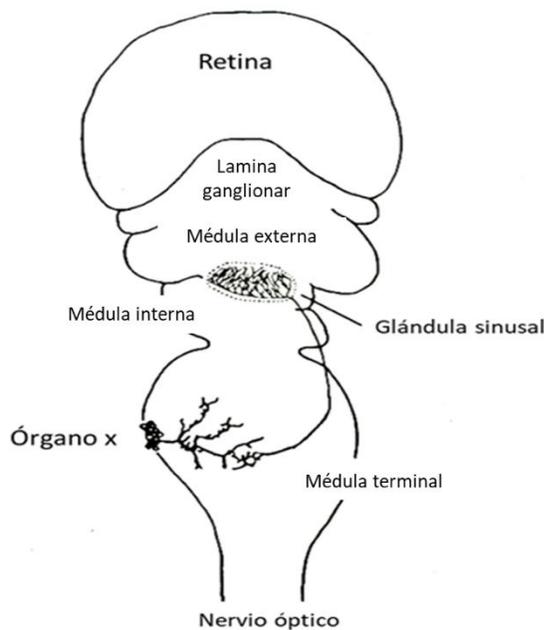


Figura 5. Representación del tallo ocular de *P. clarkii*. Vista dorsal del tallo ocular donde se muestra las zonas anatómicas que lo forman incluido el sistema peptidérgico órgano X – glándula sinusal. En la *medulla terminalis* se encuentra el cúmulo celular que forma el órgano X, y en el quiasma de la médula externa se encuentran las terminaciones axónicas de las neuronas del órgano X que forman la glándula sinusal. Tomada de Garduño, 2000.

V. Antecedentes

García y Fiorentino (2018) han reportado que en las neuronas del órgano X del acocil *P. clarkii* existen cambios en la corriente de fuga inducidos por cambios en la temperatura, a través de la aplicación de rampas de voltaje a temperaturas de 22 °C como control y de 17 °C y 27 °C en condiciones de K⁺ simétrico (Figura 6). Estos autores proponen que el comportamiento lineal de la relación I–V sugiere que la corriente de fuga se debe a canales K2P, posiblemente del tipo TREK, puesto que la conductancia unitaria calculada en registros de canal unitario es de aproximadamente 170 pS, además de algunas características farmacológicas como la sensibilidad al ácido araquidónico, al BL-1249, y a la acidificación del medio intracelular, así como a la deformación mecánica de la membrana, es bloqueado por el tetrahexilamonio (THexA), la quinidina, el Ba²⁺ y la fluoxetina. Además, en los registros de corrientes unitarias espontáneas a las temperaturas mencionadas, observaron una disminución de eventos a 17 °C y una rápida recuperación cuando la temperatura regresó a 22

°C. Sin embargo, cuando la temperatura aumentó a 27 °C, el número de eventos incrementó con un $Q_{10} = 11$, por lo que sugieren que este canal sea la vía de permeabilidad iónica responsable de los cambios en el potencial de membrana en reposo asociados a cambios en la temperatura.

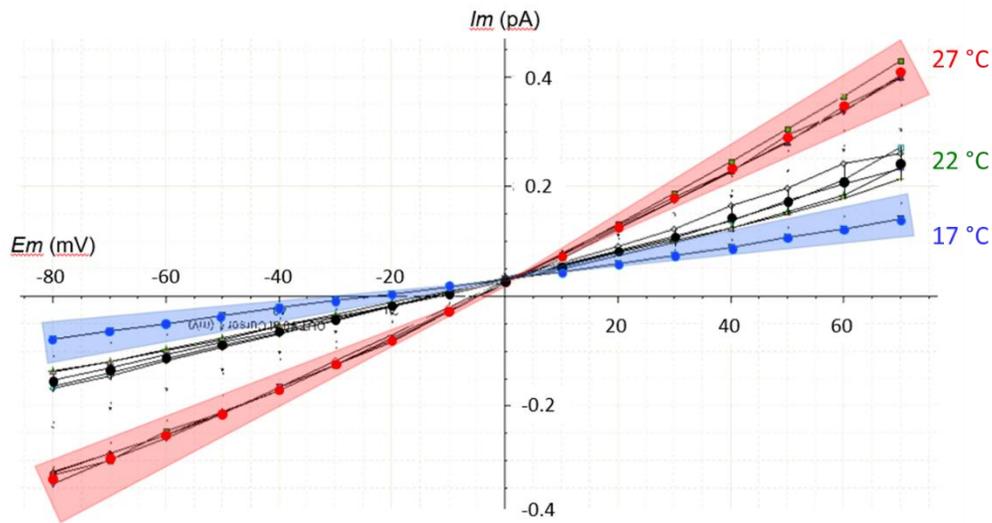


Figura 6. Relación corriente-voltaje de células del OX. Registro en célula completa de 93 células del OX de acocil en condiciones de K^+ simétrico como se describe en el texto, donde se observa la respuesta a diferentes valores de potencial en tres condiciones de temperatura diferentes (17, 22 y 27 °C).

Por ello, Hernández-Martínez (2019) buscó en el transcriptoma (banco de secuencias de ARN mensajero) del tallo ocular del acocil *P. clarkii* (Manfrin *et al.*, 2014) cuáles secuencias de canales de la familia K2P presenta potencialmente el organismo. Usó como sonda las secuencias de aminoácidos de canales de dos dominios de poro presentes en otros organismos para determinar el tipo de canal K2P relacionado con la sensibilidad a la temperatura. Reconoció los ARNm de tres secuencias que potencialmente codificarían subunidades homólogas a secuencias de canales K2P nombradas Pck2P A, B y C.

Las secuencias fueron amplificadas por RT-PCR, y clonadas en el vector de expresión pRES2-EGFP que contiene el sitio interno IRES entre el sitio múltiple de clonación y la región codificante para la EGFP (proteína verde fluorescente) la cual se utiliza como

gen reportero, generando plásmidos bicistrónicos útiles para la transfección de células con la construcción.

La Figura 7 muestra la comparación de las tres secuencias de aminoácidos deducidas a partir de la secuenciación de los ADNc clonados de *P. clarkii* (pcK2PA, pcK2PB y pcK2PC) donde se resalta la presencia de los dominios transmembranales (TM1–TM4) y los dominios de poro (P1 y P2) lo que sugiere que podrían corresponder a subunidades formadoras de canales K2P. Las secuencias predichas tienen una longitud de 417 aminoácidos (aa) para la secuencia A, de 358 aa para la secuencia B y de 402 aa para la secuencia C. Además, se realizó el alineamiento múltiple de cada secuencia, con secuencias de canales K2P reportadas en otros organismos (humano, ratón, termita, cazuela de mar, alacrán, avispa, chinche y mosca de la fruta), encontrando que la secuencia A del acocil tiene una similitud de 39% a nivel aminoácidos con secuencias de la subfamilia TREK presentes en *Homo sapiens*, la secuencia B del 64% con secuencias de la subfamilia TWIK presentes en la termita *Zootermopsis nevadensis* y la secuencia C del 71% con secuencias de canales tipo TASK encontradas en la chinche *Cimex lectularius*. Este resultado fue confirmado gracias a la búsqueda de regiones o motivos presentes en las secuencias de los canales K2P y conservadas en las secuencias clonadas (Hernández-Martínez, 2019).

pcK2PA	-----MDSHQSVVLCVVYAMFLMLGGVMFMFLLEHEMSETI	35
pcK2PB	MVDGKMVSETLKNMYPQLPTLTKMAKSNRLRLAYIVLYLIFLVLGAAIFSAIEAP--DEI	58
pcK2PC	-----MKKQNVRTVSLIVCTFTYLLVGAAVFDALSEHER--	35
	.. : : * : : * : : * : : *	
	TM1	
pcK2PA	EVTPEPEWTRLKEVALQVEPPPDEGELLSLALWLPKACPDIEENNVHTLVVPGQRVYAIN	95
pcK2PB	EMMRAIRRRRS-----KFLLDFFC--ISDSLEELIVEI-----IS	92
pcK2PC	-----RKSELLFEIEKQLKEN-----YSIEESDY--LLL-----	62
	* : : * : : *	
pcK2PA	EVERECPHLHVENVTVEVRYPWGFMDALFFSMTVITIGYGNISPSQAPAQITCILYSLV	155
pcK2PB	ANNRG---VSAAKNVTSEPNWSFGQSPFFSSTIVTTIGYGHVHPLSEGGKIFCIIYAI	148
pcK2PC	-----ETVVLQGVPHKAGQQWKFAGAFYATTVITIGYGHSTPNTVSKVFTILYAMY	116
	* * : : : * : : * : : * : : *	
	P1 TM2	
pcK2PA	GIPLTGILLAWSSEFFG-EQ--LFKLFKSKLDVQRQHSRGLMATAIYIFIGFV-VFIF	211
pcK2PB	GIPMTFILLTALVERLLLPAWLLYLWLSKLGHLVYQ-PFNIKRVPHLAIVGVIAFV-LFMV	206
pcK2PC	GIPLCVLVLFHSIGERLNMVSSIAIRHIKILKQCQDTEID---LI-LVVTTLSTITIT	172
	***: : * : : : : * : : : : *	
	TM3	
pcK2PA	IPGAVFVTL-EWTVYESIYYAYITLTTIGFGDLVPGQGYDGW-SLYIYQICVILWVLIG	269
pcK2PB	FPSLIFAKLEPGWDFLDSLYYCFISLTTIGLGDYIPGDAQDP-MRPLYKVCITGYLLLG	265
pcK2PC	SGAAVFSRYE-RWSYFDSVYYCVITLTTIGFGDMVALQKDHALDQKPEYVAFALIFILFG	231
	. : * * * : : * : : * : : * : : *	
	P2 TM4	
pcK2PA	LGWVMVANFITKALKSKKLQSSVMRSAEEMR---KIMQQMGIKQHDPTFLRQHSKATLN	326
pcK2PB	LTFFVMLLLHLVNDI-PQLNLGLFLRSAAAPGDFPERMRLSGTAGVTPKYTQQHNDQTVR	324
pcK2PC	MAIVAASLNLFVLRF-----VTMNTEDERRDEAEALQAAA-----GAVR	270
	: : : : : : : : : : *	
pcK2PA	LMLQLS--NIIAVQGGTDNGIGVNGSG---PSSPGGHSPASPP-----LSP-I	370
pcK2PB	QNVKVV--SR-----PV--D---SPSPEEDTPVHAQ-----MPPII	354
pcK2PC	LEGDVI TANGSILSGQCPQEGASFTDLTSVCSCTCASCHAFFFRPSYSFRKRSMNLSYIL	330
	. : : : *	
pcK2PA	PGISALFGNLSR--SAPLSHLMGPMRREENDESKCTEEITTVTVRYKS-----	417
pcK2PB	PGNQ-----	358
pcK2PC	PRRQRRQQRRDQQQHQHREQQHQQQMQQREEQE--REREEIQVTHTDQEEELCSSSSSESGV	388
	* .	
pcK2PA	-----	417
pcK2PB	-----	358
pcK2PC	LHTPTHAQKRNSV	401

Figura 7. Dominios característicos de las tres subunidades de canales K2P de *P. clarkii* identificadas. Se pueden observar dentro de recuadros color azul los cuatro dominios transmembranales (TM1 a –TM4) y dentro de recuadros color negro los dos dominios de filtro de selectividad para K⁺ (P1 y P2); estos dominios están presentes en las tres subunidades. En color azul se muestran los aminoácidos ácidos, en rosa los aminoácidos básicos, en verde los aminoácidos polares sin carga y de color rojo los aminoácidos no polares o hidrofóbicos.

VI. Hipótesis

La proteína codificada por el ADNc pck2PA, clonado a partir del tallo ocular de *P. clarkii*, representa una subunidad formadora de canales de la subfamilia TREK, que se expresa en las neuronas del sistema OX–GS.

VII. Objetivo general

Caracterizar las propiedades electrofisiológicas de la proteína que potencialmente constituye una subunidad formadora de canales de la subfamilia TREK, clonada a partir del tallo ocular del acocil *P. clarkii*.

VIII. Objetivos particulares

- a) Transfectar las células HEK-293T con el ADNc Pck2PA insertado en el plásmido bicistrónico pIRES2-EGFP.
- b) Caracterizar la relación corriente-voltaje, en la configuración de célula completa, de la subunidad Pck2PA.
- c) Determinar mediante el registro de canal unitario la conductancia unitaria del canal formado por la subunidad Pck2PA, y usar esta información para establecer la posible identidad de este canal.
- d) Identificar si la corriente generada por canal formado por la subunidad Pck2PA es sensible a cambios en la temperatura.

Materiales y métodos

I. Amplificación del plásmido pIRES2-PcK2PA

Se realizó la amplificación del plásmido mediante la transformación por choque térmico de bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α , las cuales fueron incubadas en cajas de Petri con medio LB y 100 μ g/ml del antibiótico Kanamicina a 37 °C durante 16 h. Pasado este tiempo se seleccionaron las colonias de bacterias y se inocularon en medio LB y kanamicina e incubaron a 37 °C a 200 rpm durante 16 h. Se recuperaron las células por centrifugación a 13,000 rpm durante 30 s. El ADN plasmídico se purificó por medio de una miniprep por columna y se realizó un análisis de restricción para caracterizarlo con la enzima PstI y corroborar su identidad.

II. Cultivo de las células HEK-293T

Para evaluar la subunidad PcK2PA se utilizó la línea celular HEK-293T (ATCC® CRL-11268™), debido a que además de ser un modelo bastante práctico y útil en la electrofisiología, sólo se presenta en su transcriptoma reportado la presencia de ARNm que codifican para subunidades TWIK-1, KCNK7 y TASK-2 (“The Human Protein Atlas”, Thul *et al.*, 2017; https://www.proteinatlas.org/search/rna_celline_detectable:HEK+293;Yes), de las cuales no se ha reportado la presencia de heterodímeros entre ellos o con subunidades de la subfamilia TREK. Las células se mantuvieron en medio D-MEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, 50 U/ml de penicilina y 5 mg/ml de estreptomina. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂. Se sembraron 1–3 $\times 10^6$ células en cajas Petri de cultivo de 35 mm un día antes de la transfección, la cual se realizó con 2 μ g de ADNc de la subunidad clonada utilizando el método de polietilenimina (PEI, 25 kDa) (Reed *et al.*, 2006). Las células, una vez transfectadas se incubaron 24–72 h, se sembraron en las cámaras de registro precubiertas con poli-L-lisina y se incubaron por al menos 1 h antes de registrarlas. Las células transfectadas fueron identificadas por epifluorescencia gracias a la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP).

III. Registro electrofisiológico

Las células HEK-293T transfectadas se registraron en fijación de voltaje utilizando las configuraciones de célula completa y la técnica de “patch-clamp” en la modalidad de *cell-attached* (Sakmann y Neher, 1983). Los registros se obtuvieron en condiciones de K⁺ simétrico, por lo que la solución salina externa tuvo la siguiente composición (en mM): 145 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES a un pH de 7.4 ajustado con KOH con una osmolaridad de 300 mOsm. Mientras que la solución interna tuvo la composición siguiente (en mM): 145 KCl, 1 MgCl₂, 5 NaCl₂, 10 HEPES a un pH de 7.4 ajustado con KOH con una osmolaridad de 300 mOsm. Las pipetas de registro se fabricaron con capilares de borosilicato (Sutter Instruments, Novato, CA, USA) con resistencias 6–10 MΩ en un estirador vertical (Model 730 David Kopf Instruments) y se llenaron con solución interna. Los cambios de temperatura se realizaron calentando o enfriando la solución externa durante su paso por la perfusión inmediatamente antes de ser liberada a la cámara de registro para llegar a la célula a 17 °C o 27 °C. La cámara de registro fue diseñada para contener un volumen de 200 μl y mantener una perfusión continua a un flujo de 1 ml/min sin que se generaran gradientes de temperatura.

Las corrientes se registraron con un amplificador Axopatch 200A (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA), filtradas a 10 kHz y se digitalizaron a 5 kHz, utilizando una interface Digidata 1440A en conjunto con pClamp 10 (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA). Se utilizó el protocolo de rampa de voltaje para llevar el potencial de membrana de -140 mV a +60 mV con una duración de 1,000 ms partiendo de un potencial de mantenimiento de 0 mV. Posteriormente se realizó este mismo protocolo a 17, a 22 y 27 °C en una misma célula. para calcular el valor del Q₁₀ con la siguiente ecuación:

$$Q_{10} = \left(\frac{X_1}{X_2} \right)^{10/(t_2-t_1)}$$

Donde t₂ corresponde a 27 °C y t₁ a 17 °C. X₂ y X₁ son las resistencias de entrada obtenidas a las dos temperaturas (Xiao, 2000). Se eligieron estas temperaturas partiendo de los 22 °C debido a que es la temperatura preferencial para el acocil.

Para el registro de canal unitario, se utilizó un protocolo de 11 pulsos cuadrados con pasos de 20 mV de -140 mV a +60 mV con duración de 500 ms, los cuales se

aplicaron de manera inversa en la modalidad de “cell-attached”. Las corrientes generadas por todos los protocolos fueron registradas por 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 Clampfit 10.7 (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA). Las respuestas de las células fueron normalizadas con los valores de las capacitancias obtenidas.

Resultados

Como se mencionó anteriormente, los canales de la subfamilia TREK son canales de fuga descritos como rectificadores abiertos y bajo ciertas condiciones presentan una rectificación saliente en condiciones de K^+ simétrico. Presentan los valores de la conductancia iónica más altos descritos dentro de los diferentes miembros de los canales K2P. Además, son modulados por varios estímulos entre ellos la temperatura. Todas estas características sirven como criterios para la caracterización de estos canales. Por estas razones, los objetivos de este trabajo fueron diseñados para verificar si la putativa subunidad expresada por la secuencia Pck2PA presenta estos comportamientos.

- I. Transfección de las células HEK-293T con el ADNc de Pck2PA insertado en el vector pIRES2-EGFP.

Para determinar si la subunidad Pck2PA clonada a partir del ARN total del tallo ocular del acocil *P. clarkii* forma canales funcionales, se analizaron mediante registros electrofisiológicos las propiedades de la proteína que se expresa a partir su ADNc aislado. Para esto primero se realizó la transfección transitoria de las células HEK-293T utilizadas como sistema de expresión heteróloga. El ADNc de la subunidad Pck2PA fue clonado en un vector de expresión bicistrónico (pIRES2-EGFP), que permite la traducción simultánea e independiente de dos péptidos, uno de los cuales es la proteína verde fluorescente usada como gen reportero (Figura 8).

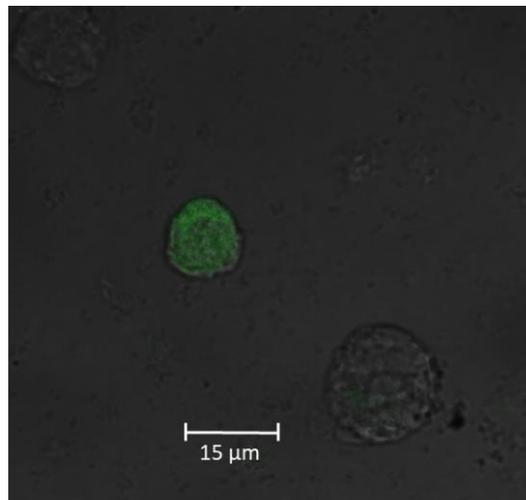


Figura 8. Microfotografía confocal de células HEK-293T transfectadas con la secuencia Pck2PA. Se pueden observar varias células HEK y en color verde se muestran aquellas que están transfectadas con la subunidad Pck2PA.

II. Caracterización de las relaciones corriente–voltaje en la configuración de célula completa de la subunidad Pck2PA.

Como se describió previamente, la familia de canales K2P generan corrientes de fuga de K^+ , cuyas relaciones corriente–voltaje tienen un comportamiento óhmico en condiciones simétricas de K^+ , es decir, sin rectificación e invirtiendo la polaridad de la corriente a ~ 0 mV. En el caso específico de la subfamilia TREK, existe una pequeña rectificación saliente, ésta puede ser ocasionada por una débil dependencia al voltaje por el canal y un bloqueo por Mg^{2+} dependiente del voltaje.

Una vez verificada la transfección de las células HEK-293T con el plásmido pRES2-Pck2PA, se procedió con el registro electrofisiológico utilizando el protocolo de rampa de voltaje descrito previamente en la configuración de célula completa en condiciones de K^+ simétrico. En la Figura 9 se muestra la corriente representativa de una célula HEK-293T transfectada con la subunidad Pck2PA y otra corriente de una célula sin transfectar, mientras que en la Figura 10 se muestra el promedio de la relación corriente–voltaje de un total de 10 registros de células transfectadas con la subunidad Pck2PA, y de tres células no transfectadas utilizando en mismo protocolo. En los trazos de corriente de las células transfectadas se puede ver un notable aumento en la amplitud de la corriente en comparación a los trazos de las células no transfectadas; además se puede observar un componente rectificador en la corriente de las células transfectadas, la cual invierte su polaridad en $E_m \approx 0$ mV. Este componente rectificador no es aparente en los registros de las células sin transfectar.

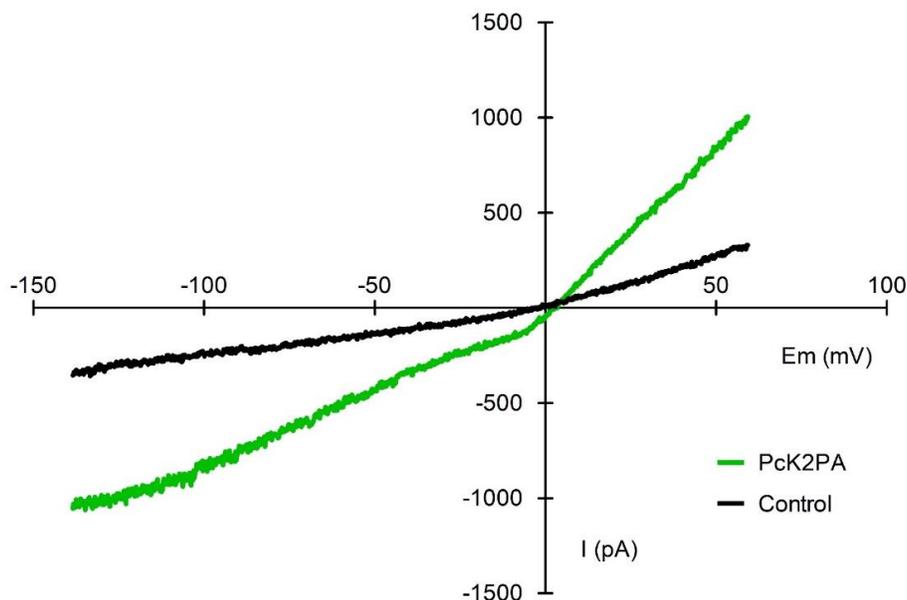


Figura 9. Registros representativos de corriente de células HEK-293T transfectadas con la subunidad Pck2PA. Protocolo de rampa de voltaje de -140 mV a 60 mV con una duración de $1,000$ ms a partir de un potencial de mantenimiento de 0 mV. Se muestran un registro representativo de la corriente de fuga en una célula transfectada con la subunidad Pck2PA (trazo en color verde) y otro de la corriente de fuga en una célula no transfectada (trazo en color negro).

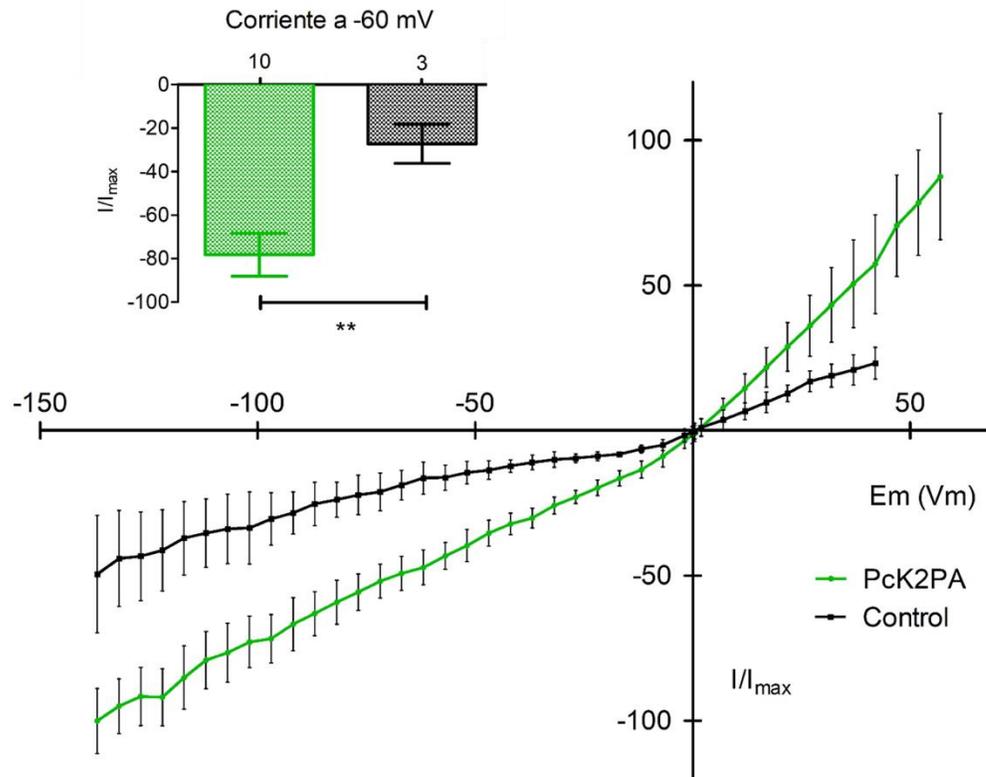


Figura 10. Relación I-V de registros de corriente de células HEK-293T transfectadas con la subunidad Pck2PA. La amplitud de la corriente se normalizó utilizando el valor máximo y se presenta como porcentaje. En A de color verde se puede ver el promedio de 10 registros de células transfectadas con la desviación estándar para cada punto, cada 5 mV. De color negro se puede ver el promedio de 3 registros de células no transfectadas. En B se observa una gráfica de columnas donde se puede ver la comparación de la amplitud de la corriente a -60 mV siendo para las células transfectadas ($n = 10$) de 423.03 pA (78.23%) y para las no transfectadas ($n = 3$) de 143.99 pA (27.18%) con una desviación estándar de 9.8 y 9.05 respectivamente. Se realizó un análisis estadístico usando la prueba de *t*-Student con un valor para $P < 0.05$, existiendo diferencias significativas entre ambas corrientes a -60 mV.

Para comparar las corrientes presentadas en la relación IV de las células transfectadas y las no transfectadas, se realizó un análisis estadístico usando la prueba de *t*-Student con un valor para $P < 0.05$, existiendo diferencias significativas entre ambas corrientes como se puede observar en las magnitudes de las corrientes a -60 mV.

III. Determinación de la identidad del canal expresado por la subunidad Pck2PA mediante la conductancia unitaria.

Utilizando el protocolo de pulsos cuadrados, se exploró de -140 mV a 60 mV la actividad de canales unitarios en la configuración de "cell-attached", obteniéndose familias de trazos de corriente con al menos un canal presente durante el registro y un tiempo de apertura mayor a los 15 ms.

Es evidente de la inspección de los registros de canal unitario de la subunidad Pck2PA la presencia de dos niveles de conductancia bien definidas (Figura 11). Dichos estados se denominaron como de alta y baja conductancia, presentando el primero un valor corriente de 9.79 ± 1.96 pA a -140 mV y un valor de $\gamma = 65.73$ pS, un comportamiento más uniforme y sostenido por evento de apertura, mientras que el segundo estado, cuyo valor de corriente de 3.74 ± 1.68 pA a -140 mV y un valor de $\gamma = 31.49$ pS, presenta un comportamiento con ráfagas, siendo menos uniforme por evento de apertura (Figura 11).

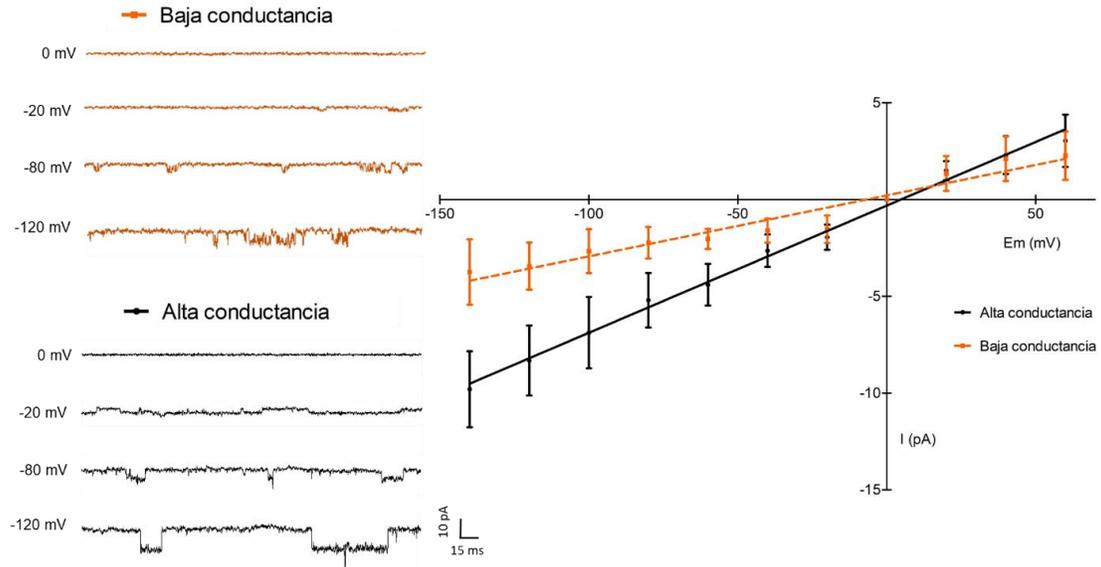


Figura 11. Relación corriente–voltaje en registros de canal unitario de los canales formados por la subunidad Pck2PA. En el lado izquierdo se pueden observar familias representativas de trazos de corriente de canal unitario del estado de baja conductancia (color naranja) y del estado de alta conductancia (color negro) en células HEK-293T transfectadas con la subunidad Pck2PA. A la derecha se muestran los promedios de las relaciones I–V de registros de los estados de baja conductancia (color naranja, n = 8) y de registros del estado de alta conductancia (color negro, n = 19). Los promedios de la γ para los estados de baja y alta conductancia fueron 31.49 pS y 65.73 pS, respectivamente.

IV. Identificación de la sensibilidad a cambios en la temperatura de la corriente generada por el canal formado por la subunidad Pck2PA

Como ya se mencionó, la subfamilia de los canales TREK es altamente sensible a los cambios en la temperatura, modificando la amplitud de la corriente que pasa a través de ellos, por lo que es crucial verificar si la subunidad formadora de canal codificada en la secuencia Pck2PA presenta dicha sensibilidad dentro del rango observado para estos canales. Por lo tanto, se realizaron registros en la modalidad de célula completa utilizando el protocolo de rampa de voltaje a diferentes temperaturas: 17, 22 y 27°C, que permiten calcular el Q_{10} para la amplitud de la corriente de fuga de K^+ .

Es importante mencionar que la temperatura es un estímulo que influye en todas las reacciones bioquímicas y su dependencia en procesos biológicos se expresa mediante el Q_{10} (Xiao, 2000), el cual fue calculado para determinar si este canal responsable de una corriente de fuga de K^+ presenta sensibilidad a cambios ante este estímulo. La Figura 11 muestra el promedio de registros a diferentes temperaturas de dos células transfectadas con Pck2PA, en donde se pueden observar cambios en la amplitud de la corriente, manifestándose sensibilidad tanto para la disminución como para el aumento de la temperatura. En esta relación corriente-voltaje se calcularon las resistencias de entrada de las células, cuyos valores fueron 368 M Ω a 17 °C, de 228.6 M Ω a 22 °C y de 113.2 M Ω a 27 °C, obteniendo un Q_{10} con valor de 3.25 para este canal.

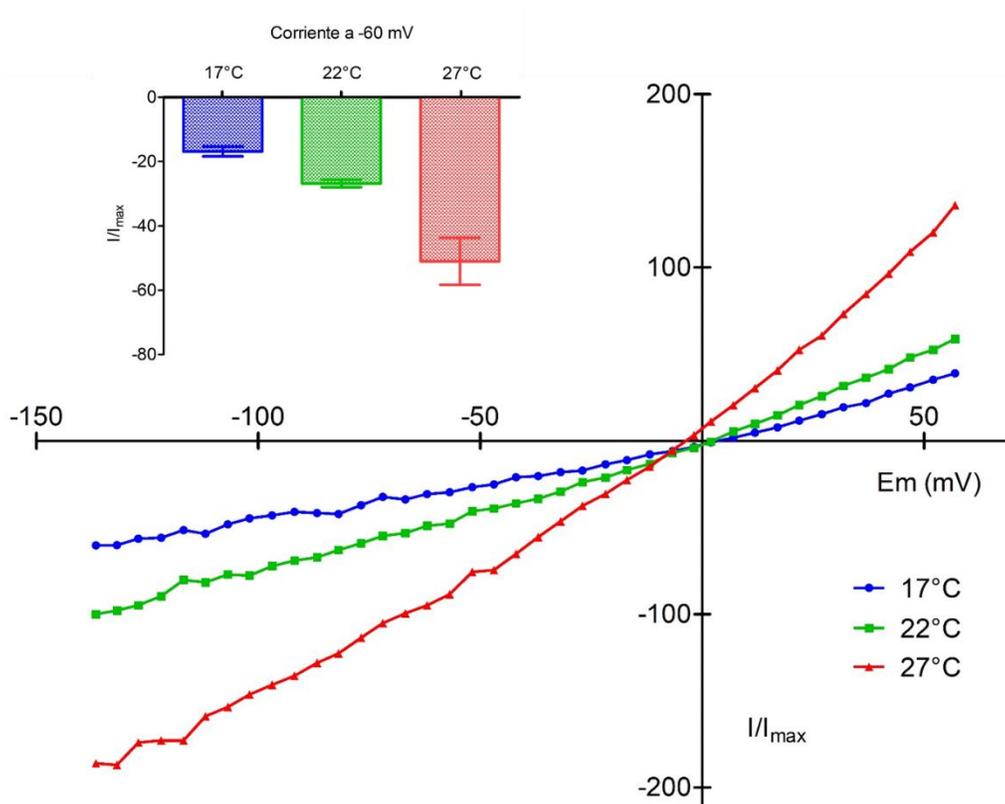


Figura 12. Relación corriente–voltaje de los cambios en la amplitud de corriente inducidos por la temperatura. La amplitud de la corriente se normalizó utilizando su valor máximo a 22 °C y se presenta como porcentaje. En A se puede observar en color azul el trazo de la corriente a 17 °C, en color verde a 22 °C y en color rojo a 27 °C; se muestran los promedios evaluados cada 5 mV. En B se observa una gráfica de columnas en la se compara la amplitud de la corriente a -60 mV, siendo para 17 °C de 262.25 pA (16.87%), para 22 °C de 417 pA (26.84%) y para 27 °C de 793.34 pA (51.05%).

Discusión

Los canales de la subfamilia TREK actúan como canales de K^+ de fuga que, a pesar de haber sido descritos en la literatura como rectificadores abiertos, presentan una rectificación saliente además de ser modulados por una gran variedad de estímulos tanto químicos como físicos, tales como la temperatura. Estos canales contribuyen a mantener el potencial de membrana en reposo, a controlar la excitabilidad de las células contrarrestando la despolarización, a traducir señales y a la regulación del metabolismo (Vivier, 2015).

En este trabajo nos propusimos caracterizar un canal de la familia K2P, nombrado Pck2PA, identificado en el tallo ocular del acocil *P. clarkii* que presenta un comportamiento similar a lo reportado por García y Fiorentino (2018), quienes, utilizando registros electrofisiológicos en neuronas presentes en el tallo ocular del acocil, lograron detectar un canal cuya corriente de fuga producida es sensible a cambios en la temperatura y lograron calcular su conductancia unitaria proponiendo que se trata de un canal de la subfamilia TREK. Además, Hernández-Martínez (2019), por medio de un análisis bioinformático, logró detectar la presencia de canales K2P en el transcriptoma del tallo ocular del acocil, y usando la secuencia predicha de aminoácidos realizó un alineamiento múltiple con secuencias K2P de otros organismos. El reconocimiento de regiones presentes tanto en las secuencias predichas como en otras usadas como referencia le permitió determinar que una de las secuencias detectadas en el transcriptoma potencialmente pertenece a la subfamilia TREK. Cabe señalar que para lograr esta caracterización se utilizó la expresión del canal Pck2PA en un sistema heterólogo de células HEK293T, determinando sus propiedades biofísicas con el uso de varios protocolos que a continuación se discutirán

- I. La sobre-expresión de la subunidad Pck2PA genera un aumento en la amplitud de la corriente de fuga

El primer protocolo utilizado fue una rampa de voltaje que permite establecer la relación corriente–voltaje por medio de la alteración del potencial de membrana de manera continua en condiciones de K^+ simétrico (Figura 8). Gracias a este protocolo se logró reconocer que en las células transfectadas la amplitud de la corriente de fuga aumenta a consecuencia de la sobre-expresión del canal Pck2PA, pese a que se ha

reportado que los canales TREK presentan una baja actividad a temperatura ambiente y en condiciones normales de presión, aun cuando éstos son sobre-expresados en sistemas heterólogos (Lamas *et al.*, 2019; Maingret *et al.*, 2000).

La corriente de fuga detectada presenta dos características importantes (Figura 9). La primera, como era de esperarse, es el cruce por el origen en la relación corriente-voltaje debido a las condiciones simétricas de K^+ , en donde a 0 mV no hay un flujo neto del ion debido a que la fuerza electromotriz a ambos lados de la membrana es la misma. La segunda característica importante es que presenta rectificación con una inflexión en la curva que cruza por el origen, como ha sido reportado por varios autores (Enyedi y Czirják, 2010; Lotshaw, 2007; Maingret *et al.*, 2000). Esto significa que más que canales rectificadores abiertos, los canales TREK son rectificadores salientes. De igual forma lo reporta Maingret y colaboradores (2002) quienes reportan en registro de canales TREK transfectados en células COS en condiciones simétricas de K^+ un potencial de inversión cercano a los 0 mV, como se espera de un canal selectivo a K^+ , y en su relación I-V permanece el componente rectificador saliente. De manera más específica Blin y colaboradores (2016) reportan que TREK-1 transfectado en células HEK-293 conduce más corriente saliente a potenciales positivos que a potenciales negativos, es decir, presenta rectificación saliente, muy similar a lo presente en la corriente producida por Pck2PA, mientras que TREK-2 muestra el comportamiento contrario, conduce más corriente a potenciales negativos que a potenciales positivos (rectificación entrante) contrario a lo producido por Pck2PA.

Dicha rectificación podría ser debida a una dependencia débil al voltaje por parte del canal y/o a un bloqueo por Mg^{2+} y Ca^{2+} dependiente de voltaje. Ambos cationes están presentes en las concentraciones que reporta Lotshaw (2007) en la solución de externa de registro. Franks y Honoré en 2004 reportan para el canal TREK-1, en condiciones simétricas de K^+ , que la rectificación saliente es provocada por el bloqueo extracelular de esos cationes divalentes a potenciales de membrana negativos. Maingret y colaboradores en 2002 lograron aumentar la amplitud de la corriente entrante al remover ambos cationes divalentes de la solución externa y encontraron que la apertura de TREK-1 dependiente de voltaje depende completamente del extremo carboxilo terminal, y que la eliminación o sustitución de esta región elimina el componente rectificador dependiente de voltaje.

II. La expresión de Pck2PA genera dos corrientes con dos diferentes conductancias

La relación corriente-voltaje del canal TREK-1 de humano en canal unitario en condiciones simétricas de K^+ presenta una conductancia entre 84–116 pS en presencia de Mg^{2+} (Lotshaw, 2007).

Como se puede ver en la Figura 10, para definir la conductancia unitaria del canal Pck2PA, se obtuvieron familias de trazos de corriente en la configuración de *cell-attached* a diferentes voltajes, observándose una cinética de ráfagas típica de los canales K2P e identificándose dos diferentes estados de conductancias. El primero, nombrado de alta conductancia con un valor de 65.73 pS con un comportamiento estable y largo en la apertura y el segundo, de baja conductancia con un valor de 31.49 pS caracterizado por ráfagas de breves aperturas interrumpidas por cierres extremadamente cortos y cierres relativamente largos entre ráfagas similar a lo encontrado por Li y colaboradores en 2006 en cardiomiocitos de rata. Estos autores encontraron que TREK-1 presenta dos isoformas, con dos sitios diferentes para el inicio de la traducción, generando dos proteínas con diferente longitud, una con un amino terminal más largo y la segunda con un amino terminal más corto, generando dos canales TREK con diferentes cinéticas, uno de alta conductancia (132 pS) y otro de baja conductancia (41 pS). Ambas isoformas fueron tranfectadas en células HEK-293, donde conservaron sus características biofísicas, pero mostraban dos estados de conductancia interconvertibles, uno alto y otro bajo, ambos modos fueron regulados por estímulos físicos y químicos.

Li y colaboradores (2006) explican que estos estados de subconductancia se deben posiblemente a modificaciones covalentes del canal o a interacciones con proteínas intracelulares accesorias que pueden inducir un segundo estado de los canales TREK-1 con diferentes conductancias. Algo similar parecería suceder con el canal Pck2PA, que podría ser una isoforma de canal TREK-1 presente en el tallo ocular con dos diferentes estados de conductancia, según las modificaciones o interacciones que pudieran ocurrir en las células HEK-293.

Por otra parte, los canales de la subfamilia TREK son los que presentan la conductancia iónica más grande de todos los canales K2P. Por ejemplo, la subfamilia TWIK presenta conductancias entre 5–32 pS, y a pesar del estado aparente de baja

conductancia del canal Pck2PA, este presenta una conductancia de 65.7 pS en el estado de alta conductancia, la cual es mayor al resto de los valores de conductancias unitaria reportados para canales K2P sugiriendo que Pck2PA pertenezca a la subfamilia TREK.

III. La corriente de fuga generada por Pck2PA es sensible a cambios de temperatura

Como se ha mencionado con anterioridad, los canales de la subfamilia TREK, son considerados como integradores de una gran variedad de estímulos, entre ellos la temperatura. Cuando la temperatura es alta, provoca la apertura del canal permitiendo la salida de K⁺ de la célula y contribuyendo a reducir la descarga de potenciales de acción. En contraste, a temperaturas bajas, el canal se cierra, permitiendo la despolarización de la célula y el disparo de potenciales de acción (Maingret *et al.*, 2000).

Con el propósito de definir si el canal Pck2PA presenta sensibilidad a la temperatura, se registraron rampas de voltaje a tres diferentes temperaturas para explorar el cambio en la amplitud de la corriente variando este parámetro (Figura 12). En la relación corriente-voltaje de la Figura 13 podemos observar que la amplitud de la corriente cambia a diferentes temperaturas. A la temperatura de 17 °C la corriente disminuye en comparación a la corriente registrada a temperatura ambiente (22 °C); en cambio, al aumentar la temperatura a 27 °C la amplitud de la corriente se incrementa. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Maingret y colaboradores en 2000, observándose que en registros de ovocitos de *Xenopus* la corriente es mínima a una temperatura baja (12 °C) y aumenta fuertemente a una mayor temperatura (37 °C), exhibiendo un comportamiento rectificador saliente al igual que el observado en nuestros registros a 27 °C. En este mismo estudio se reportó que la máxima sensibilidad a la temperatura del canal TREK-1 es observada entre los 32 y 37°C con un incremento de 9 veces la amplitud de la corriente por cada 10 °C.

Algo similar ocurre en los registros reportados por Kang y colaboradores en 2005 en células COS-7 transfectadas con la subunidad TREK-2 de rata. Ellos exploraron un rango de 24–42°C y encontraron que existe una corriente basal a 24 °C y un incremento en la temperatura produce un incremento gradual en la corriente sin

retardo, concluyendo que el calor induce un incremento en la corriente de TREK-2 de manera independiente de voltaje y que entre 24 y 37°C existe un aumento en la actividad del canal de 14 veces cada 10 °C. Además, en registros de canal unitario comprobaron que la temperatura no cambia la conductancia, concluyendo al igual que que García y Fiorentino en 2018, que el incremento en la actividad del canal producido por un aumento en la temperatura se debe a un incremento en la frecuencia de su apertura.

Ambos trabajos reportan, un Q_{10} alto en comparación al que se ha calculado para los registros obtenidos en células HEK-293T transfectadas con Pck2PA. Se usó la resistencia de las corrientes a diferentes temperaturas (Figura 12) teniéndose un valor de Q_{10} de 3.25, esto puede ser debido a la falta de registros con este protocolo, aunque se puede apreciar una notable modulación de la temperatura sobre la amplitud de la corriente producida por Pck2PA.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se ponen en evidencia la presencia de una corriente de fuga de K^+ la cual presenta un comportamiento rectificador saliente producido por la subunidad transfectada Pck2PA, lo que apunta que este canal pertenece a la subfamilia TREK y más específicamente sea un canal TREK-1. Esta subunidad formadora de canal presenta dos tipos de conductancias en las células HEK293T, un alta y una baja, las cuales también sugieren que se trata de un canal de la subfamilia TREK, que aunado a la sensibilidad a cambios en la temperatura complementa estos resultados y sugiere su identidad como TREK-1. A pesar de la evidencia de que la subunidad Pck2PA pertenezca a la subfamilia TREK, es necesario explorar con más detalle las características de dicho canal aumentando el número de registros de canal unitario, así como de registros a diferentes temperaturas tanto en la configuración de célula completa, así como en la configuración de *cell-attached*.

Referencias

- Alvarado-Álvarez, R.; R. Becerra & U. García. 1993. Electrotonic coupling between neurosecretory cells in the crayfish eyestalk. *Brain Res.* 613: 43-48
- Alvarado-Alvarez R., Aréchiga, H. & García U. 2000. Serotonin activates a Ca^{2+} -dependent K^+ current in identified peptidergic neurons from the crayfish. *J. Exp. Biol.* 2003: 715-723.
- Blin S., Ben Soussia I., Kim E. J., Brau F., Kang D., Lesage F. 2016. Mixing and matching TREK/TRAAK subunits generate heterodimeric K2P channels with unique properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113:4200–4205.
- Brohawn, S. G., del Mármol, J., & MacKinnon, R. 2012. Crystal structure of the human K2P TRAAK, a lipid- and mechano-sensitive K^+ ion channel. *Science.* 335: 436-441.
- Christensen, A., Chatelain, F., Huttner, I., Olesen, M., Soka, M., Feliciangeli, S., Horvat, C., Santiago, C., Vandenberg, J., Schmitt, N., Olesen, S., Lesage, F. and Fatkin, D. 2016. The two-pore domain potassium channel, TWIK-1, has a role in the regulation of heart rate and atrial size. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 97: 24-35.
- Choe S. 2002. Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci.* 3:115–121.
- Coetzee W.; Y. Amarillo, J. Chiu, A. Chow. 1999. Molecular diversity of K channels. *Annual New York Academic of science.* 233-285.
- Dedman A., Sharif-Naeini R., Folgering J., Duprat F., Patel., Honoré E. 2009. The mechano-gated K2P channel TREK-1. *European Journal of Neuroscience* 38:293–303
- Doring F.; H. Scholz, R. P. Kuhnlein, A. Karschin y E. Wischmeyer. 2006. Novel *Drosophila* two-pore domain K^+ channels: rescue of channel function by heteromeric assembly. *European Journal of Neuroscience.* 24: 2264–2274.
- Doyle D. A., Cabral J. M., Pfuetzner R. A., Kuo A., Gulbis J. M., Cohen S. L., Chait B. T., MacKinnon R. 1998. The structure of the potassium channel: Molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *Science* 280. Pp. 69–77.

- Elio S. M.; E. Padoa-Schioppa, J. Ott, F. Bernardi, G. F. Ficetola. 2014. Assessing the consequences of biological invasions on species with complex life cycles: Impact of the alien crayfish *Procambarus clarkii* on Odonata. *Ecological Indicators*. 46: 70–77.
- Enyedi P. & Czirjak G. 2010 Molecular Background of Leak K⁺ Currents: Two-Pore Domain Potassium Channels. *Physiol Rev* 90: 559–605
- Franks, N. P. & Honoré, E. 2004. The TREK K2P channels and their role in general anaesthesia and neuroprotection. *Trends Pharmacology. Sci.* 25, 601–608.
- Feliciangeli S.; Frank C., Delphine B. & Lesage F. 2015. The family of K2P channels: salient structural and functional properties. *J Physiol* 593 (12): 2587–2603
- Franks, N. P., & Honore, E. 2004. The TREK K2P channels and their role in general anesthesia and neuroprotection. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25, 601–608.
- García-Colunga, J. Valdiosera, R. & U. García. 1999. P-type Ca²⁺ current in crayfish peptidergic neurones. *J. Exp. Biol.* 202 (4): 429-440.
- García U. & H. Arechiga. 1998. Regulation of crustacean neurosecretory cell activity. *Cell. Mol. Neurobiol.* 18: 81-99
- García U., Cuaxospa J. M., Fiorentino R. & Gomez E. 2012. Efecto de los oligómeros β amiloide 42 en canales iónicos neurales. CXV Reunión Reglamentaria AIP. 195-206.
- García U. & Fiorentino R. 2018. Transducción termoelectrónica en el sistema peptidérgico Organo X – Glandula sinusal del acocil *Procambarus clarkii*. CXXVII Reunión Reglamentaria AIP. 111-119.
- Garduño-Torres J. 2000. Caracterización de un sistema de transporte para GABA en neuronas peptidérgicas de acocil. Tesis doctoral. Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. México.
- Goldstein S. A. N., Bockenhauer D., Zilberberg N. 2001. Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nat. Rev. Neurosci.* 2. 175–184.

Gonzalez, C.; D. Baez-Nieto, I. Valencia, I. Oyarzun, P. Rojas, D. Naranjo and R. Latorre. 2012. K⁺ Channels: Function-Structural Overview. *Comprehensive Physiology*. 2: 2087-149.

Hernández-Martínez J. M. 2019. Clonación de subunidades de canales de potasio de dos dominios de poro (K2P) presentes en el tallo ocular del acocil *Procambarus clarkii* (Tesis que para obtener título Biólogo). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México.

Hille, B. 2001. Ionic channels of excitable membranes. 3rd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc.

Honoré E. 2007. The neuronal background K2P channels: focus on TREK1. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 251–261.

Li, X. T., Dyachenko, V., Zuzarte, M., Putzke, C., Preisig-Muller, R., Isenberg, G., & Daut, J. 2006. The stretch-activated potassium channel TREK-1 in rat cardiac ventricular muscle. *Cardiovascular Research*, 69, 86–97.

Jezzini S. H.; S. Reagin, A. B. Kohn, L. L. Moroz. 2006. Molecular characterization and expression of a two-pore domain potassium channel in the CNS of *Aplysia californica*. *Brain research*. 1094(1):47-56.

Kang, D., Choe, C., & Kim, D. 2005. Thermosensitivity of the two-pore domain K⁺ channels TREK-2 and TRAAK. *The Journal of Physiology*, 564, 103–116.

Kuang Q., Purhonen P., Hebert H. 2015. Structure of potassium channels. *Cellular and Molecular Life Science*. 72(19): 3677–3693.

Lamas J. A., Rueda-Ruzafa L. y S. Herrera-Pérez. 2019. Ion Channels and Thermosensitivity: TRP, TREK, or Both?. *International Journal of Molecular Sciences*. Universidad of Vigo Spain. 20, 2371.

Lotshaw D.P. 2007. Biophysical, pharmacological, and functional characteristics of cloned and native mammalian two-pore domain K⁺ channels. *Cell Biochemistry Biophysics*. 47:209-256.

Manfrin C.; M. Tom, G. Moro, M. Gerdol. P. G. Giulianini. A. Pallavicini. 2014. The eyestalk transcriptome of red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Gene*. 557: 28–34.

Martínez, J. J., Onetti, C. G., García, E. & Hernández, S. 1991. Potassium current kinetics in bursting secretory neurons: effects of intracellular calcium. *J. Neurophysiol.* 66: 1455-1461.

Maingret, F., Lauritzen, I., Patel, A. J., Heurteaux, C., Reyes, R., Lesage, F., Lazdunski, M., y Honore, E. 2000. TREK-1 is a heat-activated background K⁺ channel. *EMBO Journal*, 19, 2483–2491.

Maingret, F., Honore, E., Lazdunski, M., & Patel, A. J. 2002. Molecular basis of voltage-dependent gating of TREK-1, a mechano-sensitive K⁺ channel. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292, 339–346.

Miller, C. 2000. An overview of the potassium channel family. *Genome Biology*. Vol 1. No4.

Momot, W. 1995. Redefining the Role of Crayfish in Aquatic Ecosystems. *Reviews in Fisheries Science*. 3: 33-63.

Nerbonne J. M. 2016. Functional and Molecular Diversity of Native Neuronal K⁺ Channels. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

Onetti C.; U. Garcia. R. Valdiosera & H. Arehiga. 1990. Ionic currents in crustacean neurosecretory cells. *Journal of Neurophysiology*. 64: 1514-1526.

Palma A. I. 2012. Efecto de la temperatura baja sobre el ritmo de actividad locomotora de *Procambarus clarkii* (acocil). Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México.

Park H.; K. Eun-Jin, H. Jaehee, H. Jongwoo y K. Dawon. 2016. Effects of analgesic and antidepressants on TREK-2 and TRESK currents. *Korean Journal of physiological pharmacol.* 20 (4): 379-385.

Patel, A. J., Honoré E., Lesage F., Fink M., Romey G., y Lazdunski M. 1999. Inhalational anaesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nature Neuroscience*. 2, 422–426.

Reed, S., Staley, E., Mayginnes, J. Pintel, D. & Tullis, G. 2006 Transfection of mammalian cells using linear polyethylenimine is a simple and effective means of producing recombinant adeno-associated virus vector. *J. Virological methods*. 138: 85-98.

- Sakmann B. & Neher E. 1983. Single-channel recording. New York, Plenum Press.
- Sanger F., Nickel S. & Coulson A. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 74(12): 5463-5467.
- Sansom M. S.; I. H. Shrivastava, J. Bright, J. Tate, C. Capener, P. Biggin. 2002. Potassium channels: structure, models, simulation. *Biochim. Biophys. Acta*. 1565:294–307
- Thul P., Åkesson L, Wiking M, Mahdessian D, Geladaki A, Ait Blal H, Alm T, Asplund A, Björk L, Breckels LM, Bäckström A, Danielsson F, Fagerberg L, Fall J, Gatto L, Gnann C, Hober S, Hjelmare M, Johansson F, Lee S, Lindskog C, Mulder J, Mulvey CM, Nilsson P, Oksvold P, Rockberg J, Schutten R, Schwenk JM, Sivertsson Å, Sjöstedt E, Skogs M, Stadler C, Sullivan DP, Tegel H, Winsnes C, Zhang C, Zwahlen M, Mardinoglu A, Pontén F, von Feilitzen K, Lilley KS, Uhlén M, Lundberg E. 2017. A subcellular map of the human proteome. *Science*. 356 (6340): (https://www.proteinatlas.org/search/rna_celline_detectable:HEK+293;Yes)
- Vivier D.; K. Bennis, F. Lesage, S. Ducki. 2015. Perspectives on the Two-Pore Domain Potassium Channel TREK-1 (TWIK-Related K⁺ Channel 1). A Novel Therapeutic Target. *Journal of Medicinal Chemistry*. 59 (11): 5149–5157.
- Xiao Y. Modelling temperature-dependency in biology by generalizing temperature coefficient Q_{10} . 2000. *Ecological. Modelling*. 127. pp. 283-290
- Zheng J. & M. Trudeau. 2015. Handbook of ion channels. CRC press, Taylor & Francis Group.

