



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Unidad Zacatenco

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

**Clonación molecular, caracterización funcional y expresión
diferencial de dos subunidades de receptores al GABA tipo A del
acocil *Procambarus clarkii***

TESIS

Que presenta

M. en C. Iván Uriel Valladares Hernández

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

En la especialidad de

Neurobiología Celular y Molecular

Directores de Tesis:

Dr. Ubaldo García Hernández

Dr. Juan Manuel Arias Montaña

Ciudad de México

Octubre, 2024

Para la realización del presente trabajo se contó con una beca de doctorado otorgada por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT; No. 631569) otorgada a Iván Uriel Valladares Hernández. También se contó con los apoyos otorgados por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), en el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), claves IN218818 e IN220524, al Dr. Juan Manuel Arias Montaña. Adicionalmente, se utilizaron recursos que fueron financiados por el Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, clave: NC19110.0 a la Dra. Edith Sánchez Jaramillo.

El trabajo experimental se realizó en tres instituciones: 1) 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); 2) en el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV - IPN), y 3) y en la sección de Investigaciones en Neurociencias, del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

AGRADECIMIENTOS

A mis sinodales de tesis: Dra. Ma. del Refugio García Villegas, Dra. Citlali Trueta Segovia, Dra. Carmen Vivar Estudillo, y Dr. Jorge Noel Quevedo Durán por la revisión y asesoramiento del presente trabajo, así como su culminación.

Al Dr. Ubaldo García Hernández y al Dr. Juan Manuel Arias Montaña, que me han enseñado muchísimo, tanto en lo profesional como personal, y agradezco generosamente la oportunidad de trabajar juntos y la confianza brindada hacia mí.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Sandra, Itzel, Nahum, Miguel, Paco, Juan, Lalo, Erick chirris y Kattia, por permitirme aprender de ustedes, por su apoyo y sugerencias dadas durante mi estancia en el laboratorio.

A Rosana y a Paco, que me ha ayudaron mucho en el trabajo de laboratorio, y a María A. Cabañas-Cortés que nos apoyó mucho con la captura de las imágenes de microscopía confocal en la Unidad de Microscopía Confocal de Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN.

DEDICATORIAS

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

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

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

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

Para mi amada Paulina, que eres mi apoyo en tantas situaciones, por el gran amor que me brindas día a día, y por la confianza que depositas en mí. Tu amor y toda tu persona me inspira a ser una mejor persona, te admiro y te amo muchísimo.

Para mis amigos de la maestría, mis amigos de ambos laboratorios, mis amigos de la carrera y aunque no mencione a cada uno de ustedes, saben que son muy importantes para mí.

CONTENIDO

ABSTRACT	1
RESUMEN	2
SIGNIFICANCE STATEMENT	3
DECLARACIÓN DE IMPACTO	4
LISTA DE ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN	6
<i>Canales iónicos activados por ligando</i>	6
<i>Superfamilia de receptores ionotrópicos del asa Cys</i>	6
<i>El GABA y sus receptores</i>	8
<i>GABA en el sistema nervioso de los invertebrados</i>	11
<i>Estructura de los receptores para GABA ionotrópicos</i>	12
<i>Ensamble de las distintas subunidades en la formación del receptor</i>	14
<i>Selectividad iónica de los receptores al GABA</i>	15
<i>GABA en el sistema Órgano X–glándula sinusal</i>	17
<i>Clonación de subunidades GABA_A del acocil</i>	19
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO GENERAL	22
<i>Objetivos particulares</i>	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
<i>Declaración de ética</i>	23
<i>Animales</i>	23
<i>Identificación de las secuencias de subunidades GABA_A en el tallo ocular del acocil</i>	24
<i>Análisis bioinformático</i>	24
<i>Extracción de ARN total y clonación molecular</i>	25
<i>Sondas de ARNc para la hibridación in situ</i>	28
<i>Cultivo celular</i>	28
<i>Evaluación electrofisiológica</i>	29
<i>Hibridación fluorescente in situ</i>	30
<i>Análisis estadístico</i>	31
RESULTADOS	32

<i>Análisis bioinformático de las dos nuevas secuencias PcGABA_A</i>	32
<i>Análisis de secuencia</i>	35
<i>Análisis filogenético</i>	37
<i>Propiedades de las subunidades PcGABA_A</i>	39
<i>Farmacología de los receptores PcGABA_A</i>	47
<i>Expresión diferencial de las subunidades PcGABA_A</i>	49
<i>Fluorescencia por hibridación in situ</i>	50
<i>Papel funcional del receptor al GABA catiónico</i>	54
DISCUSIÓN	56
CONCLUSIONES	65
BIBLIOGRAFÍA	66

ABSTRACT

In this work, we cloned and functionally expressed two novel GABA_A receptor subunits from *Procambarus clarkii* crayfish. These two new subunits, PcGABA_A- α and PcGABA_A- β 2, revealed significant sequence homology with the PcGABA_A- β subunit, previously identified in our laboratory. In addition, while PcGABA_A- α subunit also shared a substantial degree of identity with the *Drosophila melanogaster* gene DmGRD (GABA and glycine-like receptor subunits of *Drosophila*), PcGABA_A- β 2 subunit shared homology with DmLCCH3 (ligand-gated chloride channel homolog 3). Electrophysiological recordings showed that the expression in HEK cells of the novel subunits, either alone or in combination, failed to form functional homo- or heteromeric receptors. However, the co-expression of PcGABA_A- α with PcGABA_A- β evoked sodium- or chloride-dependent currents that accurately reproduced the time course of the GABA-evoked currents in the X-organ neurons from crayfish, suggesting that these GABA subunits combine to form two types of GABA receptors, one with cationic selectivity filter while the other preferentially permeates anions. On the other hand, PcGABA_A- β 2 and PcGABA_A- β co-expression generated a chloride current that does not show desensitization. Muscimol reproduced the time course of GABA-evoked currents in all functional receptors, and picrotoxin blocked these currents; bicuculline did not block any of the recorded currents. RT-PCR amplifications and FISH revealed that PcGABA_A- α and PcGABA_A- β 2 are predominantly expressed in the crayfish nervous system. Altogether, these findings provide the first evidence of a neural GABA-gated cationic channel in the crayfish, increasing our understanding of the role of these new GABA_A receptor subunits in native heteromeric receptors.

RESUMEN

En este trabajo se identificaron, clonaron y evaluaron funcionalmente dos secuencias formadoras de receptores a GABA_A del acocil *Procambarus clarkii*. Estas dos nuevas secuencias, PcGABA_A- α y PcGABA_A- β 2, muestran un alto grado de identidad y homología con la subunidad PcGABA_A- β , previamente identificada en nuestro laboratorio. Adicionalmente, la subunidad PcGABA_A- α comparte un alto grado de identidad con el gen descrito de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, DmGRD (GABA and glycine-like receptor subunits of *Drosophila*), mientras que la subunidad PcGABA_A- β 2 comparte mayor identidad con la subunidad DmLCCH3 (ligand-gated chloride channel homolog 3). Los registros electrofisiológicos mostraron que la expresión de estas subunidades en la línea celular HEK293T, expresadas individualmente o en combinación entre ellas, no forman receptores funcionales. Sin embargo, la co-expresión de cualquiera de ellas con la subunidad PcGABA_A- β favorece la formación de receptores funcionales. La co-expresión de las subunidades PcGABA_A- α con PcGABA_A- β evoca corrientes transitorias que son dependientes de sodio o cloruro, las cuales son muy similares a las corrientes observadas en las neuronas del órgano X del acocil. Lo anterior sugiere que estas subunidades se combinan para formar receptores activados por GABA, con permeabilidad catiónica y con selectividad aniónica. Por otro lado, la co-expresión de las subunidades PcGABA_A- β 2 y PcGABA_A- β generó corrientes de cloruro que no muestran desensibilización. El muscimol reproduce el curso temporal de las corrientes evocadas por GABA de todos los receptores funcionales reportados en este trabajo. Además, la picrotoxina bloquea las corrientes evocadas con GABA, mientras que la bicuculina no afecta estas corrientes. Las amplificaciones por la RT-PCR y las señales obtenidas por FISH muestran que las subunidades PcGABA_A- α y PcGABA_A- β 2 son expresadas predominantemente en el sistema nervioso del acocil. Todos estos hallazgos muestran, por primera vez, evidencia de un receptor neuronal activado por el GABA con selectividad catiónica en el acocil, aumentando el conocimiento de receptores activados por GABA formados por distintas subunidades del acocil *P. clarkii*.

SIGNIFICANCE STATEMENT

For decades, crustacean GABAergic neurotransmission has been studied, leading to the elucidation of several neural responses mediated by GABA_A receptors. Molecular cloning techniques have helped us to understand how GABA subunits assemble to form functional receptors. For the first time, here we report two novel GABA_A receptor subunits, PcGABA_A- α and PcGABA_A- β 2. GABA_A subunits homologous to those described herein have been reported in the arthropod group, making it possible to establish kinship relationships between species and the search for a common ancestor. PcGABA_A- α or PcGABA_A- β 2 subunits, when combined with PcGABA_A- β , form functional GABA_A receptors with different ionic selectivity; therefore, it was necessary to explore, at a molecular level, the differences in the amino acid sequence that determine these properties. As a result, discovering new GABA_A receptor subunits with distinct structural and functional properties will significantly contribute to our knowledge of how GABA_A receptors may mediate dual behavior in neural transmission, governing excitatory or inhibitory inputs in invertebrate animals.

DECLARACIÓN DE IMPACTO

Durante décadas, la neurotransmisión GABAérgica ha sido estudiada en los crustáceos, y esto ha permitido entender muchos de las respuestas mediadas por los receptores GABA_A. Las técnicas de biología molecular han ayudado a entender cómo es que el ensamble de algunas subunidades es necesario para formar receptores funcionales. Por primera vez, en este trabajo se reportan dos nuevas subunidades formadoras de receptores GABA_A, PcGABA_A- α y PcGABA_A- β 2. Estas subunidades son homólogas a las subunidades encontradas y reportadas de algunos artrópodos, lo que sugiere la existencia de un ancestro en común entre distintas especies. Las subunidades PcGABA_A- α y PcGABA_A- β 2 no forman receptores funcionales cuando son expresadas individualmente o en combinación entre ellas, sin embargo, cuando se combinan con la subunidad PcGABA_A- β , se forman receptores heteroméricos funcionales con diferentes propiedades y selectividad iónica. Para entender dichas propiedades es importante considerar las características moleculares de cada subunidad, así como determinar las diferencias que existen en las secuencias de aminoácidos de cada una de ellas. Como resultado se obtiene el descubrimiento de dos nuevos receptores GABA_A con propiedades funcionales y estructurales que contribuyen al conocimiento y entendimiento de los receptores GABA_A de invertebrado, resaltando la importancia de receptores con la subunidad PcGABA_A- α que forma receptores de tipo catiónico, los cuales pueden participar modulando la excitabilidad de las neuronas del órgano X del acocil.

LISTA DE ABREVIATURAS

CX13C – motivo del asa cys

EC50 – concentración efectiva media

DEC – Dominio extracelular

EXP-1 – proteína defectuosa de la expulsión

FISH – Hibridación fluorescente *in situ*

GABA – ácido γ -aminobutírico

GRD – GABA and glycine-like receptor of *Drosophila*

HEK 293T – células de riñón de embrión humano 293

DIC – dominio intracelular

LCCH3 – ligand-gated chloride channel homolog 3

LGC-35 – ligand-gated ion channel 35

LGICs – canales iónicos activados por ligando

n_H – coeficiente de Hill

NMDG – *N*-Metil-D-glucamina

PTX – picrotoxina

RDL – locus resistente a la dieldrina

TM – dominio transmembranal

INTRODUCCIÓN

Canales iónicos activados por ligando

Los canales iónicos activados por ligando (LGICs, por sus siglas en inglés), son proteínas de membrana que contienen un poro que permite regular el flujo de ciertos iones a través de la membrana plasmática. Estos canales median la transmisión sináptica rápida y son activados por distintos mecanismos, ya sea por la unión de un ligando, por cambios en la tensión de la membrana, o bien, por la producción de mensajeros químicos en el interior celular (Keramidas et al., 2004). El criterio para clasificar estos receptores deriva de los distintos dominios transmembranales, los cuales les confieren distintas propiedades funcionales. Estos canales son clasificados en tres superfamilias: receptores activados por ATP (o receptores purinérgicos), receptores activados por glutamato, y los receptores del asa Cys y cada uno de ellos tiene un ensamble diferente, por ejemplo, los receptores purinérgicos forma estructuras triméricas; los receptores de glutamato son estructuras tetraméricas, mientras que los receptores del asa Cys son estructuras pentaméricas (Alexander et al., 2019; Rao et al., 2022).

Superfamilia de receptores ionotrópicos del asa Cys

Los receptores ionotrópicos del asa Cys son activados por distintos neurotransmisores, y la unión del neurotransmisor con el receptor promueve un cambio conformacional en la proteína que permite la activación y apertura del canal iónico, resultando en un cambio del potencial de membrana de la célula nerviosa (Keramidas et al., 2004; Lester, 1992). Actualmente, se han agrupado a estos receptores por su parentesco filogenético y la conservación de motivos funcionales, tal como lo es el asa cys, un motivo formado por un par de cisteínas separadas por 13 aminoácidos y que forman un enlace disulfuro. Dicho motivo se ha conservado entre estos receptores, tanto en vertebrados como en invertebrados, dando lugar a la superfamilia de receptores del asa Cys (Keramidas et al., 2004; Ortells & Lunt, 1995; Thompson et al., 2010).

Un criterio funcional que ha permitido clasificar a estos receptores en dos categorías es la selectividad iónica que tienen estos receptores y el cambio en el potencial de

membrana asociado a dicha permeabilidad iónica, es decir, se pueden clasificar como receptores aniónicos o catiónicos (Lester et al., 2004; Thompson et al., 2010).

Los principales LGICs de tipo aniónico permiten el paso de iones Cl^- , cuyo gradiente de concentración en organismos adultos favorece su flujo hacia el interior de la célula, favoreciendo la hiperpolarización de la membrana. Algunos receptores aniónicos son los receptores para glicina (GlyR), los receptores para el ácido γ -aminobutírico (GABA_AR), y los receptores de glutamato (GluClR) e histamina (HisClR), recientemente reportados en invertebrados. Por otro lado, los LGICs de tipo catiónico permiten el paso de cationes (Na^+ , K^+ y/o Ca^{2+}), que favorece la despolarización de la membrana y aumentan la probabilidad de disparo de una neurona. Los miembros que conforman este grupo son los receptores de acetilcolina (AChR), los receptores tipo 3 de 5-hidroxitriptamina (5-HT₃R), y los receptores activados por Zn^{2+} (ZAC) (Keramidas et al., 2004; Smart & Stephenson, 2019).

Es importante resaltar que actualmente se siguen caracterizando nuevos miembros de esta superfamilia de receptores LGIC en invertebrados, y que resultan ser excepciones al criterio descrito; por ejemplo, el receptor MOD-1 es activado por 5-HT y tiene permeabilidad aniónica, o bien, el receptor EXP-1 que es activado por GABA y que tiene una permeabilidad catiónica (Beg & Jorgensen, 2003; Ranganathan et al., 2000). Además, se han descrito dos miembros de receptores activados por ligando de estructura pentamérica provenientes de los patógenos bacterianos *Erwinia chrysanthemi* y *Gloeobacter violaceus*, conocidos como ELIC y GLIC (*Erwinia* o *Gloeobacter* ligand-gated ion channel, respectivamente) (Bocquet et al., 2009; Hilf & Dutzler, 2009). En la Tabla 1 se resumen algunos miembros de la superfamilia y su permeabilidad iónica.

Tabla 1. Miembros actualmente conocidos de la superfamilia del asa Cys de vertebrados e invertebrados (modificada de Lester *et al.*, 2004).

En vertebrados			
Ligando	Nombre del receptor	Iones permeables	Número de subunidades conocidas
ACh	Receptor de ACh	Cationes	≥16
5-HT	Receptor de 5-HT ₃	Cationes	≥2
GABA	Receptor de GABA _A	Aniones	≥19
Glicina	Receptor de Glicina	Aniones	≥5
Zn²⁺	ZAC	Cationes	1
En invertebrados			
Glutamato	GluCl	Aniones	≥2
5-HT	MOD-1	Aniones	1
GABA	EXP-1	Cationes	1
	LGC-35		1
	GRD+LCCH3		≥2
Histamina	HisCl	Aniones	≥2

Todos los miembros que forman parte de esta familia comparten homología en la secuencia de aminoácidos y similitudes estructurales, por lo que es posible que todas hayan evolucionado de un gen ancestral común (Le Novère & Changeux, 1995; Sigel & Steinmann, 2012).

El GABA y sus receptores

Hace más de medio siglo que el ácido γ -aminobutírico (GABA) fue encontrado y caracterizado en preparaciones de crustáceo y de mamífero (Awapara *et al.*, 1950; Roberts & Frankel, 1950; Kuffler, 1954; Kuffler & Edwards, 1958) y es considerado

como el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso de animales adultos. Dicha inhibición consiste en la hiperpolarización de la membrana y, por lo tanto, en la disminución de la excitabilidad. Aproximadamente el 30% de las neuronas en el sistema nervioso central (SNC) de mamíferos producen GABA, y prácticamente todas las neuronas pueden responder a este neurotransmisor (Kleppner & Tobin, 2002).

Se han descrito dos tipos de receptores para el GABA, los ionotrópicos GABA_A y los metabotrópicos GABA_B. Los primeros son canales iónicos que pertenecen a la gran familia del asa-Cys (Olsen & Tobin, 1990), selectivos para el cloruro, y cuyas corrientes iónicas resultan en la inhibición sináptica rápida. Por otro lado, los receptores GABA_B están acoplados a proteínas G triméricas (i/o) (Bowery, 1993; Xu et al., 2014), y participan en la inhibición sináptica lenta, debido a la serie de eventos intracelulares que involucran, tales como la apertura de canales de potasio de rectificación entrante (GIRK), o bien, la inhibición de canales de calcio dependientes de voltaje, así como la modulación de la actividad de la enzima adenilato ciclasa. Adicionalmente, estos receptores se ensamblan con dos distintas subunidades R1 y R2, las cuales necesitan combinarse para formar a un receptor funcional (Bettler et al., 2004; Smart & Stephenson, 2019). La Figura 1 ilustra los tipos de receptores a GABA ya mencionados.

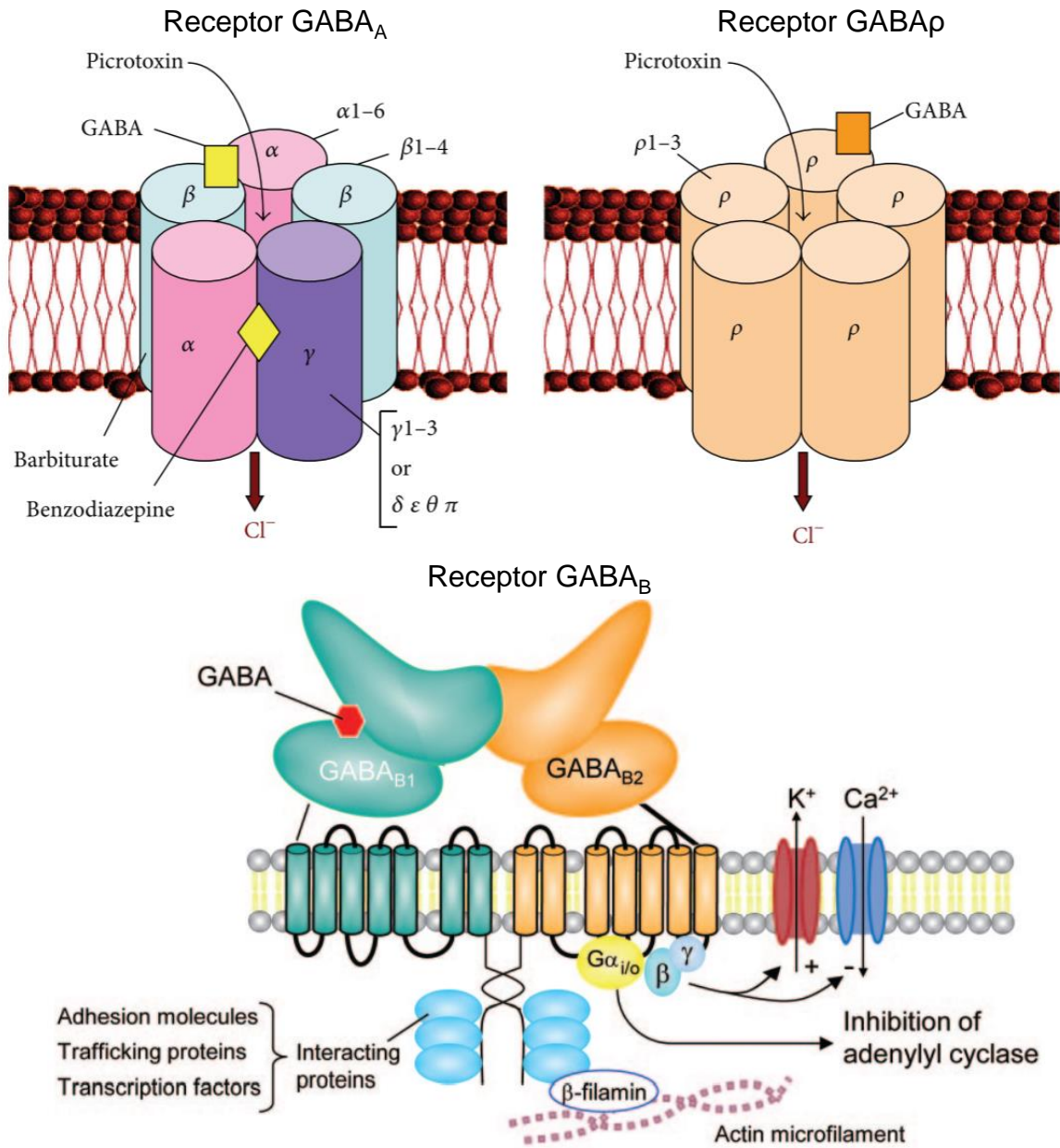


Figura 1. Tipos de receptores activados por el GABA. En la parte superior de la ilustración se muestran los receptores ionotrópicos. Los receptores GABA_A se forman por diferentes subunidades y son regulados por barbitúricos y benzodiazepinas. Por otra parte, existen un subtipo de receptores GABA_A conocidos como receptores GABA_ρ que se forman por las subunidades ρ y son insensibles a los moduladores de los receptores GABA_A. Ambos tipos de receptores son canales iónicos que permiten el flujo de iones cloruro. En la parte inferior de la imagen se muestra al receptor GABA_B, el cual está acoplado a una proteína G heterotrimérica, donde la proteína efectora puede ser el complejo β/γ o la misma subunidad α de la proteína G (Modificado de Benarroch, 2012; Macdonald & Botzolakis, 2010).

GABA en el sistema nervioso de los invertebrados

La respuesta electrofisiológica al GABA fue inicialmente descrita en preparaciones de invertebrados, tales como el acocil (Kuffler, 1954; Boistel & Fatt, 1958; Edwards & Ottosont, 1958; Van Der Kloot et al., 1958). Dichos trabajos en sinapsis periféricas de crustáceos mostraron que la respuesta al GABA provocaba un aumento en la conductancia al cloruro, es decir, la inhibición GABAérgica convencional (Boistel & Fatt, 1958; Kuffler & Edwards, 1958; Takeuchi & Takeuchi, 1965, 1966). Las características farmacológicas más relevantes de la respuesta GABAérgica pusieron de manifiesto que la bicuculina y la picrotoxina son antagonistas, en tanto el muscimol mimetiza los efectos del GABA (Furshpan & Potter, 1959; Olsen & Tobin, 1990).

Posteriormente se reportó una respuesta similar a la mediada por los receptores GABA_A pero insensible a la bicuculina o baclofeno, y activada por el ácido *cis*-aminocrotónico (*c*-ACA). Además, dicha respuesta no era regulada por barbitúricos y benzodiazepinas, lo que sugirió la existencia de un nuevo receptor denominado GABA_C. Tras la clonación de la subunidad ρ , se pudo reproducir la respuesta dada por el receptor GABA_C (Cutting et al., 1991), y fue hasta 1998 que la Unión Internacional de Farmacología propuso que los receptores GABA_C en realidad eran un subtipo de los receptores GABA_A pero conformados de forma diferente, por lo que le asignó el nombre de receptores GABA ρ (Bormann & Feigenspan, 1995; Collingridge et al., 2009).

En años recientes, se han reportado en invertebrados la existencia de receptores al GABA cuya activación resulta en un aumento en la conductancia a sodio (Beg & Jorgensen, 2003; Gisselmann et al., 2004; Jobson et al., 2015), lo que conlleva a una excitación celular, particularmente de células musculares. Por otro lado, el efecto excitador provocado por el GABA en neuronas fue descrito por primera vez en 2016 por (Jiménez-Vázquez et al., 2016), sin embargo, la estructura de dicho receptor o receptores aún no ha sido resuelta.

Estructura de los receptores GABA ionotrópicos

Los receptores activados por el GABA pertenecen a la superfamilia de los LGICs, particularmente a la familia de receptores del asa-Cys. Estos receptores participan en las sinapsis inhibitoras rápidas y regulan la actividad neuronal de forma tónica (Brickley & Mody, 2012; Kasaragod et al., 2022). De acuerdo con la IUPHAR (The International Union of Basic and Clinical Pharmacology), en vertebrados se han descrito al menos 19 subunidades de receptores activados por GABA, las cuales, de acuerdo con su homología, han sido clasificados en 8 subclases: α (1–6), β (1–3), γ (1–3), δ , ε , π , θ , y ρ (1–3).

Estas subunidades se combinan para formar un complejo pentamérico con una estructura central que forma el poro del receptor. La oligomerización de estas subunidades puede ser heteromérica (con diferentes tipos de subunidades) u homomérica (que incluye un tipo único de subunidad), siendo la subunidad GABA ρ la única que puede formar receptores homo-pentaméricos en vertebrados (Figura 2). Todas las subunidades que forman los receptores tienen la misma estructura topológica que consiste en: 1) un extremo extracelular (ECD), en donde se encuentra el motivo del asa-Cys, y los sitios de unión para el neurotransmisor; 2) cuatro segmentos transmembranales (TM1–4), donde el TM2 forma la pared del canal iónico; 3) asas intra y extracelulares que conectan cada TM, donde el asa TM1–TM2 determina el filtro de selectividad del canal; y 4) un asa intracelular muy grande que conecta a los segmentos transmembranales TM3 y TM4, también considerado como un dominio intracelular (ICD), con funciones particulares como determinar la localización del receptor en la membrana plasmática (Chang et al., 1996).

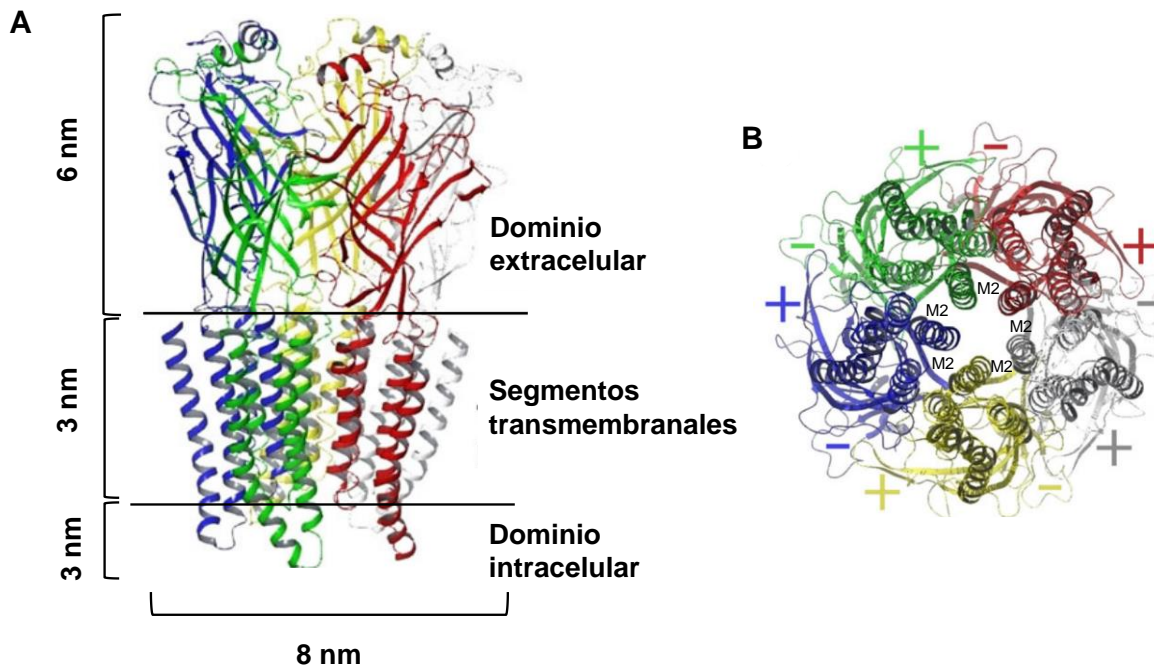


Figura 2. Estructura de los receptores de la familia del asa Cys. (A) Los receptores GABA_A y GABA_B pertenecen a la gran familia de receptores del asa Cys, los cuales se caracterizan por formar complejos pentaméricos. Cada subunidad tiene una estructura topológica similar, con un dominio extracelular en donde se encuentra el sitio de unión al agonista, así como el motivo del asa Cys; también tiene cuatro segmentos transmembranales, y asas intracelulares que forman el dominio intracelular. (B) El receptor puede estar formado de distintas subunidades, y en el arreglo pentamérico del receptor, el M2 de cada subunidad contribuye en la formación del poro del canal. El modelo no está a escala. Modificado de (Naffaa et al., 2017).

El dominio extracelular está conformado por láminas plegadas β , y es la región donde se encuentran la mayoría de los sitios de modificación postraduccional de cada subunidad (Gupta & Brunak, 2002; Lummis, 2009). De manera interesante, los segmentos transmembranales contienen motivos conservados que forman las hélices α , mientras que los dominios intracelulares son regiones muy variables, involucradas con el ensamble, el direccionamiento y agrupamiento del receptor (Chua & Chebib, 2017).

Estos receptores se mantienen cerrados mientras no exista una interacción con el agonista y tras la unión del ligando, el receptor sufre una serie de cambios conformacionales que conllevan a la apertura del poro del receptor, proceso llamado

“gating”. Se sabe que se requiere de dos moléculas del agonista para activar al receptor. Una vez abierto el canal, hay un flujo iónico masivo en cuestión de milisegundos. Resulta de particular interés que las múltiples combinaciones le confieran distintas propiedades electrofisiológicas al receptor, aunado al hecho de que algunas subunidades por sí mismas pueden formar receptores GABA_A homopentaméricos de manera nativa (Hackam et al., 1997). Por lo tanto, a pesar de la gran cantidad de estudios llevados a cabo en sistemas de expresión heterólogos (ovocitos de *Xenopus laevis* y células de mamífero), aún queda mucho para entender el mecanismo por el cual un receptor adquiere una estequiometría dada, o cuáles son las “reglas” para el ensamblaje de un receptor conformado por distintas subunidades.

Ensamble de las distintas subunidades en la formación del receptor

Para la formación de los receptores GABA_A, se requiere la selección de las subunidades y su incorporación en receptores funcionales. Un mecanismo que se ha propuesto para la oligomerización del receptor es que las subunidades se incorporan por acción de masas (ensamblaje al azar) (Fisher & Macdonald, 1997). Sin embargo, se ha observado que dicha oligomerización parece no depender de la disponibilidad de subunidades expresadas, lo que podría sugerir que se trata de ensamblaje preferencial (Chang et al., 1996).

Por otro lado, se ha reconocido que los genes que codifican para las distintas subunidades de los receptores GABA_A están organizados en 4 grupos en los cromosomas 4, 5, 15 y X del genoma humano. En estos cromosomas existen dos agrupaciones con 4 genes: $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\beta 1$ y $\gamma 1$ en el cromosoma 4, y $\alpha 1$, $\alpha 6$, $\beta 2$ y $\gamma 2$ en el cromosoma 5, mientras las otras dos agrupaciones tienen 3 genes, $\alpha 5$, $\beta 3$ y $\gamma 3$ en el cromosoma 15 y, $\alpha 3$, ϵ y θ en el cromosoma X. A estas agrupaciones se les ha atribuido una expresión coordinada de genes, dada principalmente por sus promotores correspondientes, permitiendo ciertos patrones de expresión temporal y espacial, así como la unión de factores de transcripción que respondan a señales celulares tales como esteroides (Darlison, Pahal, & Thode, 2005).

Recientemente se ha reportado que ciertas subunidades α ($\alpha 1$ y $\alpha 6$) poseen señales intrínsecas relacionadas con la N-glucosilación. Dichas modificaciones en ambas subunidades α parecen ser necesarias para formar parte de diferentes receptores pentaméricos al reclutar a las demás subunidades. Por otro lado, la subunidad $\gamma 2$ es necesaria para la localización celular del receptor en la membrana plasmática y, que la subunidad δ restringe la formación complejos proteicos entre subunidades $\alpha 6$ y $\gamma 2$ (Martenson et al., 2017).

Tales datos han sido obtenidos de estudios con subunidades de los receptores GABA_A de vertebrados y conllevan a la creencia de que hay condiciones de ensamblaje estrictas que determinan la estequiometría del receptor que, si bien están determinadas por patrones de expresión, también lo están principalmente por interacciones entre las subunidades (Chang et al., 1996). Un aspecto adicional y no menos importante es la selectividad iónica del receptor, y aunque todas las subunidades del pentámero contienen determinantes moleculares que sugieren la selectividad iónica del canal, no todas las asas del poro contribuyen de la misma manera (Jensen et al., 2002).

Selectividad iónica de los receptores al GABA

Como ya se mencionó, de manera convencional se sabe que los receptores GABA_A median la inhibición sináptica rápida mediante un flujo aniónico hacia el interior de la neurona. La selectividad iónica de estos receptores está asociada a la presencia de aminoácidos críticos en las posiciones -2 y -1 del TM2, región que se alinea entre los cinco TM2 para formar un poro cuando se oligomerizan cinco subunidades (Thompson et al., 2010). Basados en la secuencia de aminoácidos de una sola subunidad, es posible predecir la selectividad del canal, es decir, si formará receptores aniónicos o catiónicos (Sigel & Steinmann, 2012). En este sentido, la mayoría de las subunidades de receptores GABA_A poseen una prolina (Pro) y una alanina (Ala) en dichas posiciones, lo cual confiere una selectividad aniónica (Hibbs and Gouaux, 2011; Jensen *et al.*, 2002). Adicionalmente, se ha reportado que el aminoácido +13 (Thr) del TM2, también puede participar en determinar la selectividad aniónica del receptor.

Por lo tanto, las subunidades GABA_A de invertebrado que forman receptores catiónicos presentan cambios al nivel molecular en el filtro de selectividad, tal como se ha observado con las subunidades CeEXP-1 y CeLGC-35 clonadas del nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Beg & Jorgensen, 2003; M. a. Jobson et al., 2015), que presentan un ácido glutámico en el filtro de selectividad y forman receptores homoméricos catiónicos. También se han reportado algo similar para las subunidades DmGRD (GABA and glycine-like receptor of *Drosophila*) y la subunidad DmLCCH3 (ligand-gated chloride channel homolog 3), clonadas de *D. melanogaster*, en donde DmGRD presenta un ácido aspártico, y necesita ser co-expresada con DmLCCH3 para formar receptores heteroméricos catiónicos (Gisselmann et al., 2004). Recientemente se ha ampliado el número conocido de subunidades homólogas de estas secuencias en otras especies de insecto, tal como es el caso de la abeja *Apis mellifera*, y el piojo humano *Pediculus humanus humanus*. En ambos casos, las secuencias también fueron nombradas subunidad GRD o LCCH3 de acuerdo con su identidad molecular (Hashim et al., 2022; Henry et al., 2020).

GABA en el sistema Órgano X–glándula sinusal

El sistema neuroendocrino Órgano X–glándula sinusal (OX–GS) ha sido ampliamente utilizado como modelo de estudio para entender el funcionamiento de neuronas peptidérgicas (García & Aréchiga, 1998). Un hallazgo interesante es que en estas neuronas el GABA provoca un aumento transitorio del disparo de potenciales de acción, seguido de una hiperpolarización de la membrana e inhibición del disparo neuronal. Las corrientes asociadas a dicha respuesta se evaluaron en condiciones de fijación de voltaje a –60 mV de potencial de membrana, y se determinó que esos eventos coinciden temporalmente con una corriente entrante transitoria, que es seguida de una corriente saliente sostenida, respectivamente (Figura 4) (Garduño et al., 2002).

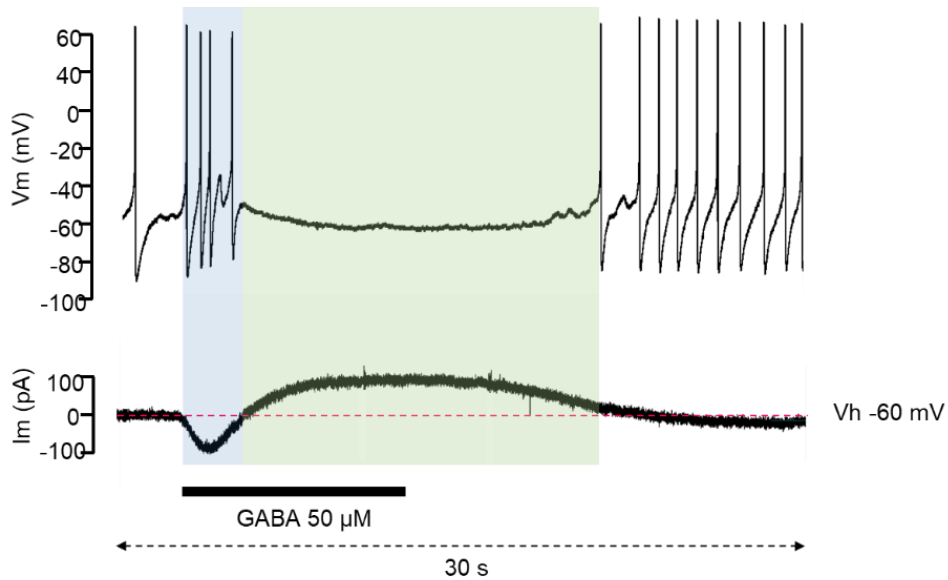


Figura 4. Efecto del GABA en neuronas del órgano X en cultivo. En la parte superior de la figura se registra la actividad eléctrica de una neurona del sistema OX-GS en fijación de corriente. Se observa que el GABA provoca una despolarización transitoria acompañada del disparo de potenciales de acción, y después prosigue un silenciamiento del disparo neuronal. En la parte inferior de la figura se muestra el registro de la misma neurona en fijación de voltaje a -60 mV de potencial de mantenimiento (Vh). Se observa que hay una corriente transitoria que corresponde con la despolarización transitoria, mientras que la corriente sostenida corresponde con la fase silente de la respuesta, lo que sugiere que las respuestas son mediadas por receptores diferentes, activados por el GABA (Garduño et al., 2002).

La caracterización en estas neuronas mostró que el GABA y el muscimol producen la misma respuesta, es decir, la respuesta transitoria y sostenida (Figura 5a–b), mientras que el ácido *cis*-amino-crotónico (c-ACA), solo evoca la respuesta sostenida (Figura 5c), demostrándose que ambas respuestas pueden ser activadas selectivamente. Adicionalmente, se evaluó la participación del sodio en las corrientes evocadas por GABA y muscimol, sustituyéndolo por *N*-Metil-D-glucamina (NMDG), lo que condujo a que la corriente transitoria se anulara, mostrando que dicha corriente es debida a sodio (Jiménez-Vázquez et al., 2016).

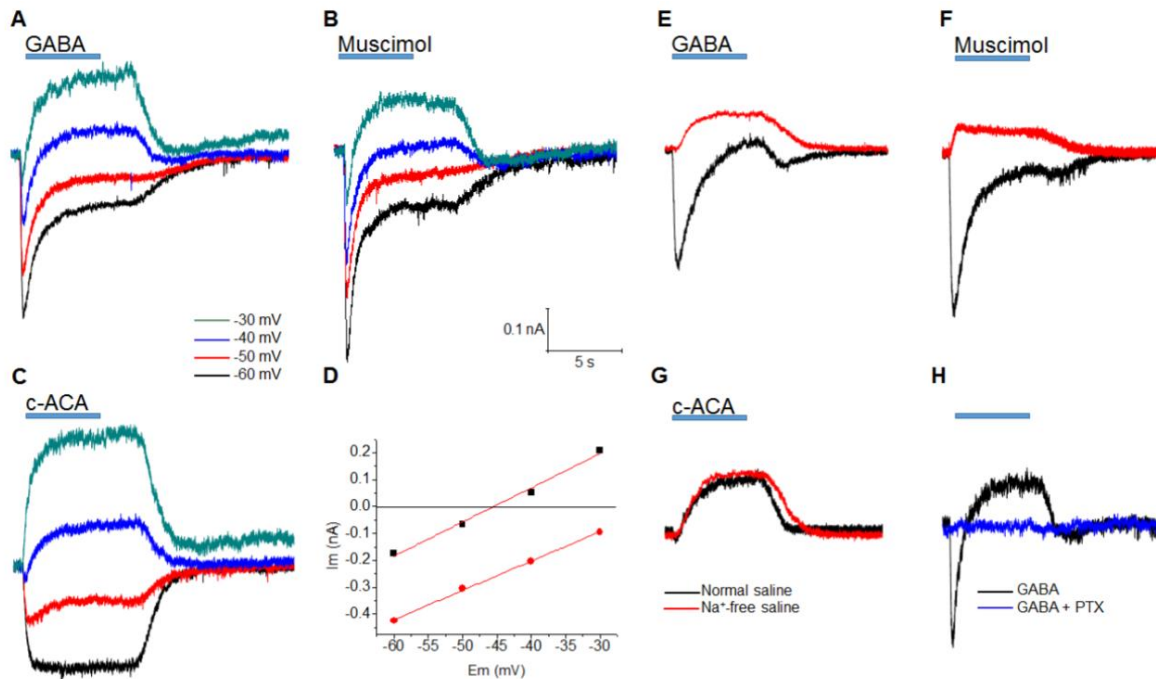


Figura 5. Corrientes representativas obtenidas aplicando distintos agonistas de los $GABA_A$ Rs durante 5 s [100 μ M], a distintos potenciales de mantenimiento, en neuronas aisladas del \acute{o} rgano X. En (A – B) se muestran las corrientes transitoria y sostenida, mientras que en (C) solo se evoca la respuesta sostenida. (D) Relaci3n corriente–voltaje al pico de las corrientes transitorias (puntos rojos), y de las sostenidas (puntos negros), en donde se aprecia que tienen distintos potenciales de inversi3n. (E – G) muestra las corrientes obtenidas al sustituir el sodio extracelular. Se observan corrientes transitorias en presencia de Na^+ extracelular (trazo negro), y su sustituci3n con NMDG las elimina; en ambos casos la corriente sostenida no fue afectada. (G) el c–ACA evoc3 la corriente sostenida y se no se modific3 la respuesta en presencia o ausencia de Na^+ . (H) muestra el efecto de la picrotoxina (100 μ M), la cual aboli3 las corrientes transitorias y sostenidas (en color azul). Tomada de (Jim3nez–V3zquez et al., 2016).

Los resultados anteriores permitieron sugerir la presencia de dos tipos de receptores al GABA, con filtros de selectividad cati3nico y ani3nico, sin embargo, ning3n receptor $GABA_A$ capaz de mediar dicha funci3n ha sido identificado al nivel molecular.

Clonaci3n de subunidades $GABA_A$ del acocil

En el 2016 (Jim3nez-V3zquez et al., 2016), tras la b3squeda de algunas subunidades que reproduzcan y expliquen la respuesta observada en dicho sistema neuronal, se clon3 la subunidad denominada Pc $GABA_A$ - β , la cual, al ser expresada

en la línea celular HEK 293T, reproducía la respuesta sostenida e inhibidora del fenómeno observado (Figura 6) en las neuronas aisladas del órgano X. El análisis farmacológico de esta subunidad determinó que el orden de potencia de los agonistas probados fue: GABA > ácido *trans*-4-aminocrotónico (*t*-ACA) = ácido *cis*-4-aminocrotónico (*c*-ACA) > muscimol (Jiménez-Vázquez *et al.*, 2016).

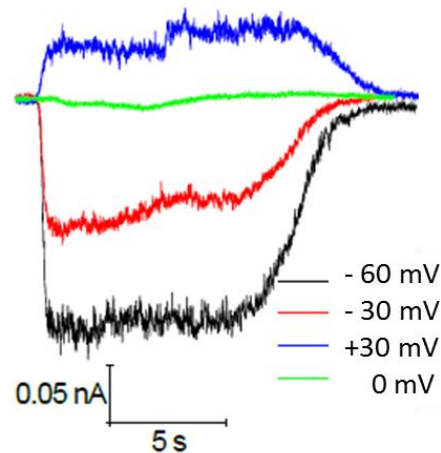


Figura 6. Corriente evocada de la subunidad PcGABA_A-β. La subunidad expresada en la línea celular HEK 293T evoca respuestas con GABA (100 μM, 5 s), a distintos potenciales de mantenimiento. La corriente es sostenida y decae varios segundos después del lavado del agonista. Tomada de (Jiménez-Vázquez *et al.*, 2016).

De este reporte se dedujo entonces que debe ser otra(s) la(s) subunidad(es) que forma(n) al receptor responsable de la respuesta excitadora. Dicho receptor podría compartir alguna similitud funcional con las subunidades que forman los receptores catiónicos reportados del nemátodo *Caenorhabditis elegans*, o de los insectos como la mosca de la fruta *D. melanogaster*, de la abeja *Apis mellifera*, y el piojo humano *Pediculus humanus humanus* (Beg & Jorgensen, 2003; Gisselmann *et al.*, 2004; Hashim *et al.*, 2022; Henry *et al.*, 2020; Jobson *et al.*, 2015). Por lo tanto, en este estudio se buscaron secuencias con alta identidad y homología a las reportadas en los insectos. Dicha búsqueda fue realizada en las bases de datos de transcriptomas reportados del acocil (Tom *et al.*, 2014; Manfrin *et al.*, 2015).

Como resultado, se identificaron dos subunidades muy similares a PcGABA_A-β (Jiménez-Vázquez, *et al.*, 2016), así como a las subunidades GRD y LCCH3 de

insectos. Estas secuencias fueron nombradas como PcGABA_A-β₂ and PcGABA_A-α por sus características moleculares. De manera interesante, estas subunidades necesitan ser co-expresadas con la subunidad PcGABA_A-β, para formar receptores funcionales, cuyas características electrofisiológicas y farmacológicas son únicas. Aún más interesante es que la combinación de las subunidades PcGABA_A-α con PcGABA_A-β, forma receptores activados con el GABA y de selectividad catiónica, el cual puede ser el responsable de mediar la respuesta excitadora observada en las neuronas del sistema neurosecretor del acocil.

HIPÓTESIS

Los receptores activados por GABA con permeabilidad catiónica reportados en invertebrados están formados por subunidades que tienen sitios de unión para el GABA y características moleculares que confieren una selectividad catiónica. Por lo tanto, la respuesta catiónica observada en las neuronas del órgano X del acocil *Procambarus clarkii*, está asociada a la expresión de subunidades que forman receptores catiónicos activados por el GABA.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las propiedades electrofisiológicas y farmacológicas de los receptores formados por las distintas subunidades GABA_A clonadas de *Procambarus clarkii*, e identificar su expresión en el tallo ocular.

Objetivos particulares

1. Identificar los motivos estructurales y funcionales de las subunidades PcGABA_A- α y PcGABA_A- β 2, a partir de su secuencia de aminoácidos.
2. Caracterizar la funcionalidad de las subunidades PcGABA_A expresadas en la línea celular HEK 293T.
3. Determinar las propiedades electrofisiológicas y farmacológicas de los receptores formados por las subunidades PcGABA_A.
4. Identificar el patrón de expresión de las subunidades PcGABA_A en regiones del tallo ocular del acocil.
5. Detectar los transcritos de PcGABA_A- α y PcGABA_A- β 2 en distintas regiones del tallo ocular del acocil.

MATERIALES Y MÉTODOS

Declaración de ética

El Comité de Cuidado de Animales del CINVESTAV aprobó el uso del acocil *P. clarkii*. Los procedimientos experimentales utilizados en este estudio fueron bajo las recomendaciones de la Guía de los Institutos Nacionales de la Salud para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Publicación No. 8023, revisado desde 1978), y por el Consejo Mexicano de Cuidado Animal (NOM-062-ZOO-1999).

Animales

Organismos adultos de *P. clarkii* fueron recolectados de la presa San Luis Taxhimay (Estado de México, México). Durante dos semanas, los organismos fueron aclimatados a periodos de luz/oscuridad 12/12 h, a temperatura ambiente (22 – 26 °C), y alimentados con rebanadas de zanahoria y croquetas para pez *ad libitum*. Los animales fueron anestesiados sepultándolos en hielo durante 15 min antes de cualquier manipulación. Los tallos oculares fueron escindidos y colocados en solución salina fría, compuesta de (mM) 205 NaCl, 5.4 KCl, 13.5 CaCl₂, 2.6 MgCl₂ y 10 HEPES, pH 7.4 ajustado con NaOH. El exoesqueleto y tejido conectivo fue meticulosamente removido de las estructuras neuronales de interés. Algunos tallos completos fueron transferidos a un homogeneizador para la extracción de ARN total.

Para la técnica de hibridación *in situ* los tallos oculares fueron extraídos y fijados en paraformaldehído al 4% en una solución de fosfatos 0.1 M (pH 7.4), durante 4 h a temperatura ambiente (~22 °C), y posteriormente las muestras fueron colocadas en una solución PBS con 25% de sacarosa durante 2 h. Finalmente, los tallos oculares fueron colocados en bloques de Tissue-Tek® con hielo seco pulverizado y almacenados a –80 °C hasta su uso. Secciones seriadas de 20 µm fueron colectadas en PBS con un criostato Leica (Leica CM3050 S, Nussloch GmbH, Germany). Las rebanadas descongeladas fueron montadas en portaobjetos Fisherbrand Superfrost Plus (Thermo Fisher Scientific; Cat #12-550-15), secadas con aire y almacenadas a –80 °C hasta su preparación para la hibridación *in situ*.

Identificación de las secuencias de subunidades GABA_A en el tallo ocular del acocil

Para la identificación de secuencias similares a subunidades GABA_A, se realizaron alineamientos múltiples (BLAST, tblast), usando como secuencias de referencia a la secuencia PcGABA_A-β de *P. clarkii*, las secuencias DmGRD y DmLCCH3 de la mosca de la fruta *D. melanogaster*, y la secuencia CeEXP-1 del nemátodo *C. elegans*, en la base de datos de los transcriptomas ensamblados del acocil (Manfrin *et al.*, 2015; Tom *et al.*, 2014). En este estudio se seleccionaron aquellas secuencias con un alto porcentaje de identidad, y que contengan las características específicas, tales como los sitios de unión para el GABA, el asa cys, y los cuatro segmentos transmembranales. Las secuencias Pc_10711 (GBEV01010683.1; GARH01000703.1) y Pc_11123 (GBEV01011095.1; GARH01034373.1), son las secuencias que contienen las características mencionadas. Dichas secuencias fueron nombradas como PcGABA_A-β2 (Pc_10711), y PcGABA_A-α (Pc_11123) basadas en sus similitudes moleculares con otras subunidades GABA_A.

Análisis bioinformático

El software A Plasmid Editor (ApE; UT, USA) (Davis & Jorgensen, 2022), fue utilizado para identificar los marcos de lectura abiertos (ORFs) de cada secuencia, y el software Clustal Omega ([EMBL-EBI](#)), fue utilizado para realizar las imágenes de los alineamientos múltiples, y para obtener los datos de porcentaje de identidad. El programa MEGA X (Molecular Evolutionary Genetic Analysis, PA, USA), fue utilizado para crear el árbol filogenético con el método de máxima probabilidad y el modelo basado en la matriz JTT (Jones *et al.*, 1992). Árboles iniciales para la búsqueda heurística fueron generados automáticamente por los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ, para generar una matriz de distancia por pares predicha utilizando el modelo JTT y seleccionando los valores de mayor probabilidad. La base de datos final generó 776 posiciones en total. El software MEGA también fue utilizado para el análisis evolutivo de las secuencias.

Las siguientes secuencias de subunidades de receptores al GABA_A fueron tomados de la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica para

construir el árbol filogenético: de *D. melanogaster*, DmGRD (CAA55144), DmLCCH3 (AAB27090); de *Apis mellifera*, AmGRD (AJE68942), AmLCCH3 (AJE68943); de *Caenorhabditis elegans*, CeEXP-1 (AAQ96595), CeLGC-35 (CAB60369); de *Homarus americanus*, Ha β 1a (AAM47020); de *Homo sapiens*, Hs α 6 (AAB36480), Hs β 3 (AAA52511); y de *P. clarkii*, PcGABA β (AKA64699). Es importante resaltar que en este trabajo se asignó a cada subunidad el nombre del gen junto con dos letras que indican la especie a la que pertenece (por ejemplo, Dm si proviene de *Drosophila melanogaster*, Am: *Apis mellifera*, Ce: *C. elegans*; Ha: *Homarus americanus*, Hs: *Homo sapiens*).

Adicionalmente, las secuencias encontradas en el transcriptoma del tallo ocular se evaluaron con servidores en línea que permiten sugerir estructuras o motivos funcionales potenciales. Para predecir la estructura topológica de proteínas de membrana, se utilizaron los servidores TMHMM – 2.0 y DeepTMHMM. Para predecir por sitios de glicosilación potenciales se utilizaron los servidores NetNGlyc – 1.0 y NetOGlyc – 4.0, y los sitios de fosforilación potenciales fueron obtenidos con NetPhos – 3.1.

Extracción de ARN total y clonación molecular

El ARN total fue extraído utilizando el protocolo de Trizol (Green & Sambrook, 2012), y fue mantenido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que el protocolo de transcripción en reversa se realizó. El ARN total fue obtenido del tallo ocular completo, o bien de distintas regiones anatómicas aisladas de esta estructura para determinar el patrón de expresión de las subunidades GABA $_A$, tales como la *médula externa*, la *médula interna*, la *médula terminal* y el órgano X. Adicionalmente, se determinó la expresión de dichas subunidades tomando una porción del tejido muscular del abdomen del organismo.

El programa Clone-Manager 9 (Scientific & Educational Software, NC, USA), fue utilizado para diseñar oligonucleótidos específicos para la secuencia PcGABA $_A$ - β 2 y para PcGABA $_A$ - α (Tabla 2). La reacción de transcripción en reversa se realizó en dos fases: 1) tomando 4 μl de ARN total (347 ng/ μl) en conjunto con 1 μL de una mezcla de oligonucleótidos en antisentido (linker-dT; oligonucleótidos específicos

r1 para cada subunidad) a una concentración final de 120 μM ; incubados a 65 °C durante 5 min, enfriándose rápidamente en hielo. En la segunda fase se añadió regulador de reacción, inhibidor de ARNasas (RiboLock; 40 U/ μL), una mezcla de dNTPs y la enzima ProtoScript® II (200 U/ μl), en un volumen final de 20 μl . La mezcla final se incubó a 42 °C durante 60 min. Finalmente, la mezcla fue incubada a 80 °C durante 5 min antes de diluir con agua a un volumen final de 100 μL .

Las amplificaciones del ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCRs), fueron preparadas en reacciones de volumen final de 25 μL , en donde se incluye 0.8 mM de desoxinucleótidos (dNTPs), 400 nM de oligonucleótidos específicos, 0.5 U de la polimerasa de AND Q5 (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) y 5 μL de ADNc. Los amplicones resultantes para PcGABA β 2 y PcGABA α fueron evaluados por análisis de restricción e insertados en el vector de clonación pJet1.2 (CloneJET™ PCR Cloning Kit, Thermo Scientific, CA, USA), que también permitió el análisis de secuenciación. Para la evaluación funcional, cada secuencia fue subclonada en el vector de expresión pIRES2–EGFP (Clontech Laboratories, CA, USA), o en un vector modificado pIRES2 que incluye a la proteína roja fluorescente (RFP), nombrado como pIRES2–RFP (datos no mostrados).

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de las secuencias PcGABA _A -β ₂ y PcGABA _A -α.	
Subunidad GABA _A	Oligonucleótido
PcGABA _A -β ₂ (Pc_10711)	β ₂ f1 – GTGTTTGCGAGGTTAAGC β ₂ f2 – CGCGAGGATATGTAAGCC
	β ₂ r1 – GGACACAACCTCGTCATGTAG β ₂ r2 – AAAGGTACGGAAGGGTAAGG
PcGABA _A -α (Pc_11123)	αf1 – GTCAAGCGAGAGTCTGAAG αf2 – CAGCACAGGGAATCCATAC αif3 – CCCTCGTTATCAGCAGCTA αif4 – CGGGTACACGGAGAAAGAT
	αr1 – CCTAGCATAGCGACACTAGG αir2 – GTCCGCACTTATCATGGTTG αir3 – CCTCCTCCGTCATAATTTCCG
PcGABA _A -β (control positivo)	βf – ATGGACCGACAGCTCTGCATCAT βr – CGGCGTATTCAAGCAGCGAAGC
Pc GAPDH (gen de referencia)	GAf – TGCTCCTGTTGCGAAAGTC GAR – CCCAAACTCGTTGTCATACC
Los oligonucleótidos fueron nombrados con una “f” si son en “sentido”, con una “r” si son en “antisentido” y con una “i” si se encuentra en la región “interna” de la secuencia codificante.	

Para determinar la expresión diferencial de las subunidades GABA_A, las secuencias fueron amplificadas utilizando 5 µl del ADNc obtenido de distintas muestras, utilizando el protocolo de PCR descrito (Jiménez-Vázquez et al., 2016). Previo a la extracción del ARN, el tejido conectivo fue meticulosamente removido de cada muestra.

Los oligonucleótidos β 2f1 - β 2r2 fueron utilizados para la amplificación de PcGABA_A- β 2, mientras que los oligonucleótidos α f1- α r2 fueron utilizados para amplificar la secuencia PcGABA_A- α . Para amplificar la secuencia PcGABA_A- β , se utilizaron los oligonucleótidos β f- β r, y para amplificar el gen de referencia, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *P. clarkii*, se utilizaron los oligonucleótidos GAf-GAr (Jiang et al., 2015).

Sondas de ARNc para la hibridación in situ

El vector de clonación pGEM-T fue modificado para contener los sitios de restricción XhoI y XbaI, como ya ha sido descrito (Jiménez-Vázquez et al., 2016). Los fragmentos de las secuencias PcGABA_A- β 2 (476 pb) o PcGABA_A- α (621 pb), que contienen las regiones 3' de las secuencias codificantes, fueron obtenidos con dichas enzimas y subclonados en ese plásmido. Posteriormente, los plásmidos fueron linearizados con la enzima apropiada, y las sondas en sentido y antisentido marcadas con digoxigenina fueron sintetizadas con las polimerasas T7 y SP6, respectivamente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7), número de catálogo 11175025910, Roche, USA).

Cultivo celular

La línea celular de riñón de embrión humano (HEK) 293 T (ATCC, CRL-1573), fue mantenida en medio Eagle modificado de Dulbecco (número de catálogo 121000038, Gibco™, NY, USA), suplementado con suero fetal bovino al 10% (número de catálogo S1810-500, BioWest, FL, USA), adicionado con 3.7 g de NaHCO₃ y 1% de solución de antibiótico/antimicótico (número de producto 15240096, Gibco™ NY, USA). Las células fueron incubadas a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂. Un día antes de la transfección, se sembraron cerca de 1.2×10^6 células en cajas de cultivo de 35 mm (Número de producto 430165, Corning, MA, USA). Para la transfección, las células incubadas con un total de 2 μ g/caja de ADNc, ya sea transfectando una secuencia o en combinación con otra (con una estequiometría de 1:1), y con 3 μ g de PEI-Prime (Número de producto 919012, Sigma-Aldrich, MO, USA) por μ g de ADNc. Las células transfectadas fueron evaluadas 24–72 h después de la transfección. Posteriormente se resembraron

$\sim 1 \times 10^3$ células en cámaras de registro pre-cubiertas con poli-L-lisina, y se incubaron al menos 1 h antes de ser evaluadas. Las células transfectadas fueron identificadas por epifluorescencia.

Evaluación electrofisiológica

Las células fueron evaluadas con el protocolo de fijación de voltaje, en célula completa, utilizando un amplificador Axopatch 200A (Molecular Devices CA, USA), y los datos fueron digitalizados y adquiridos con el sistema de adquisición Axon Digidata 1440A (Molecular Devices CA, USA). Las micropipetas de borosilicato con resistencias que variaron entre 5–10 M Ω fueron elaboradas con un estirador vertical Modelo 730 (David Kopf Instruments), y fueron llenadas con solución normal interna que contiene (en mM): 140 KCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES y pH de 7.4 ajustado con KOH. La solución externa contiene (en mM): 120 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂ y 10 HEPES, pH 7.4 ajustado con NaOH, y fue perfundida continuamente a un flujo de 2–3 mL/min. Para evaluar las corrientes dependientes de sodio, la N-Metil-D-glucamina fue utilizada para reemplazar al sodio. La solución libre de sodio contiene (en mM): 140 NMDG-Cl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, y 10 HEPES, con pH de 7.4 ajustado con NMDG-Cl. Para demostrar la permeabilidad para el ion sodio, las corrientes fueron evaluadas en una solución con sodio que contiene (en mM): 150 NaCl, y 10 HEPES, con pH de 7.4 ajustado con NaOH. Esta solución fue utilizada tanto en la pipeta como en la solución de registro. Posteriormente, la solución con sodio fue sustituida por una solución de NMDG-Cl, la cual contiene (en mM): 150 NMDG-Cl, y 10 HEPES, con pH de 7.4 ajustado con NMDG. De esta manera, la solución de NMDG sólo modifica el potencial de equilibrio para el sodio, pero no se modifica el potencial de equilibrio predicho para el cloruro.

Los agonistas GABA y muscimol, y los antagonistas picrotoxina y bicuculina fueron comprados de Sigma-Aldrich (MO, USA). El GABA, el muscimol y la bicuculina fueron preparados en agua y utilizados en la solución de registro. En contraste, la picrotoxina fue preparada en DMSO, a una concentración de 10 mM y diluida en la solución de registro a una concentración final en la cual el DMSO no excedió el 0.1%. Las aplicaciones del GABA y del muscimol fueron realizadas con un sistema

de tubo en Y, conectado a una válvula magnética. Las respuestas evocadas por GABA fueron obtenidas con pulsos de dicho agonista a 100 μM , durante 5 s, a distintos potenciales de mantenimiento, variando desde -60 a $+20$ mV. Para la evaluación concentración-respuesta, cada célula transfectada fue mantenida a un potencial de -60 mV, y con aplicaciones de 1 s del GABA o del muscimol a concentraciones crecientes (3, 10, 30, 100, 300 o 1,000 μM), seguidas de 2 min de lavado entre cada pulso. La picrotoxina o la bicuculina fueron perfundidas en la solución externa a una concentración de 100 μM . Todos los registros fueron realizados a temperatura ambiente (~ 22 °C).

Hibridación fluorescente *in situ*

La hibridación *in situ* fue realizada como se ha descrito (Sánchez-Jaramillo et al., 2022). Brevemente, secciones longitudinales del tallo ocular del acocil, de 20 μm de grosor, fueron incubados con las sondas marcadas con digoxigenina-UTP, con: a) sonda antisentido de PcGABA $_{\text{A}}$ - α , b) sonda sentido de PcGABA $_{\text{A}}$ - α , c) sonda antisentido de PcGABA $_{\text{A}}$ - $\beta 2$, y d) sonda sentido de PcGABA $_{\text{A}}$ - $\beta 2$. Posteriormente, los tejidos fueron fijados en paraformaldehído 4% disuelto en buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7.4), durante 10 min, y se enjuagaron con PBS durante 5 min, seguidos de un proceso de acetilado con 0.25% de anhídrido acético en trietanolamina al 0.1 M durante 10 min, deshidratado a través de concentraciones crecientes de alcohol (70%, 80%, 95%, 100%; cada 2 min), y con cloroformo durante 10 min, parcialmente hidratado en alcohol al 95%, para finalmente ser procesado para la hibridación *in situ*. Una mezcla de las ribosondas marcadas 100 ng/mL fue añadido a 80 μl de buffer de hibridación (50% de formamida, 2 \times de solución de citrato de sodio salino [SSC], 1 \times de solución de Denhardt, 10 mM de ditioneitol [DTT], 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ADN desnaturalizado de esperma de salmón, 10% de dextrán sulfato, y 0.5% de duodecil sulfato sódico [SDS]), fue incubada en cada sección del tallo ocular cortada, montada en un cubreobjetos y sellada con papel Parafilm, incubada a 54 °C durante toda la noche. Posteriormente, los cubreobjetos fueron removidos y las secciones fueron enjuagadas con 1 \times SSC (0.15 M citrato trisódico, 0.015 M de cloruro de sodio), durante 15 min a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C), digeridas con ARNasa A (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; número de catálogo 4875, Sigma, USA) por 1 h a 37 °C,

enjuagadas con 1× SSC durante 15 min a temperatura ambiente, luego enjuagadas con 0.5× SSC durante 15 min a 65 °C con 0.1× SSC dos veces más durante 30 min a 65 °C. La especificidad de la hibridación de la sonda antisentido fue verificada utilizando la sonda sentido, la cual resultó en la ausencia de señal de hibridación en el tejido de interés.

Las sondas marcadas fueron detectadas con un anticuerpo anti-digoxigenina, conjugado con peroxidasa (diluido 1:100 en 1% solución de bloqueo, número de catálogo 11096176001, Roche, USA). La señal digoxigenina-UTP fue ampliada con el sistema de tiramida (TSA), con el kit TSA™ Plus Biotina (número de catálogo NEL749B001KT, Perkin Elmer, USA), durante 30 min, utilizando el reactivo de amplificación en una dilución 1:100 en 0.05 M de Tris (pH 7.5) que contiene 0.01% de H₂O₂.

La señal de biotina fue detectada con Alexa Fluor 488 conjugado con estreptavidina (número de catálogo S32354, Invitrogen, USA), o con Alexa Fluor 555 conjugada con estreptavidina (número de catálogo S32355, Invitrogen, USA). Las secciones fueron enjuagadas minuciosamente en PBS y Tris 0.05 M (pH 7.5), y cubiertas con medio de montaje antifade Vectashield con DAPI (número de catálogo H-2000, Vector Laboratories, USA). Las imágenes de confocal fueron obtenidas con un microscopio confocal Leica DMI 8000 (Wetzlar, Germany). El programa ImageJ (Maryland, USA), fue utilizado para la edición y análisis de las imágenes.

Análisis estadístico

Cada experimento fue realizado con al menos 5 células registradas. La adquisición y análisis de datos fue realizado utilizando pClamp 8.0 (Molecular Devices CA, USA), y los resultados fueron ajustados con GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, CA, USA). El programa Origin 8.0 (OriginLab Corporation, MA, USA), fue utilizado para la elaboración de las gráficas. Las curvas concentración-respuesta fueron normalizadas a la corriente máxima, y los datos son reportados como media y error estándar de la media. La concentración efectiva 50 y el coeficiente de Hill (n_H) fueron determinados utilizando un análisis de regresión no lineal con la ecuación *log (agonist) vs. response–variable slope* (GraphPad Prism 5, CA, USA).

RESULTADOS

En este trabajo se identificaron y caracterizaron dos nuevas secuencias de subunidades de receptores al GABA_A del tallo ocular del acocil *P. clarkii*. La caracterización electrofisiológica y farmacológica permitió identificar receptores ionotrópicos activados por el GABA con propiedades únicas, las cuales se asemejan a las respuestas nativas observadas en las neuronas del acocil. Adicionalmente, la amplificación del ADNc y la FISH de cada secuencia mostró que estas subunidades son ampliamente expresadas tanto en el órgano X, como en todo el tallo ocular.

Análisis bioinformático de las dos nuevas secuencias PcGABA_A

Las secuencias Pc_10711 y Pc_11123, fueron identificadas como dos transcritos de ARNm similares a la secuencia PcGABA_A-β (número de acceso AKA64699), las cuales fueron identificadas utilizando el algoritmo tBLASTn en la base de datos de transcriptomas ensamblados (TSA) de *P. clarkii*, (Manfrin et al., 2015; Tom et al., 2014). De acuerdo con las características moleculares de estas secuencias, fueron nombradas subunidades PcGABA_A-β2 y PcGABA_A-α, respectivamente (números de acceso OQ446622 and OQ446623). Las secuencias completas de cada transcrito, incluyendo regiones 5'– y 3'–UTR, fueron clonadas utilizando el protocolo de PCR acoplada a la transcripción inversa a partir del ARN total obtenido del tallo ocular del acocil.

La secuencia PcGABA_A-β2 tiene una longitud de 1,624 b, con un marco de lectura de 1,403 b el cual codifica para una potencial proteína de 481 aminoácidos. Por otro lado, la secuencia completa de PcGABA_A-α tiene una longitud de 1,728 b con un marco de lectura de 1,530 b que codifica para una potencial proteína de 510 aminoácidos. Ambas secuencias contienen la región del asa Cys, que consiste en un enlace disulfuro entre dos cisteínas separadas por 13 aminoácidos, tal como se ilustra en la Figura 7 (con asteriscos). Además, ambas secuencias se identificaron varias características moleculares que están presentes en otras subunidades formadoras de receptores del asa Cys, las cuales incluyen la estructura topológica general que corresponde a extremos amino y carboxilo extracelulares (Figuras 8 y 9).

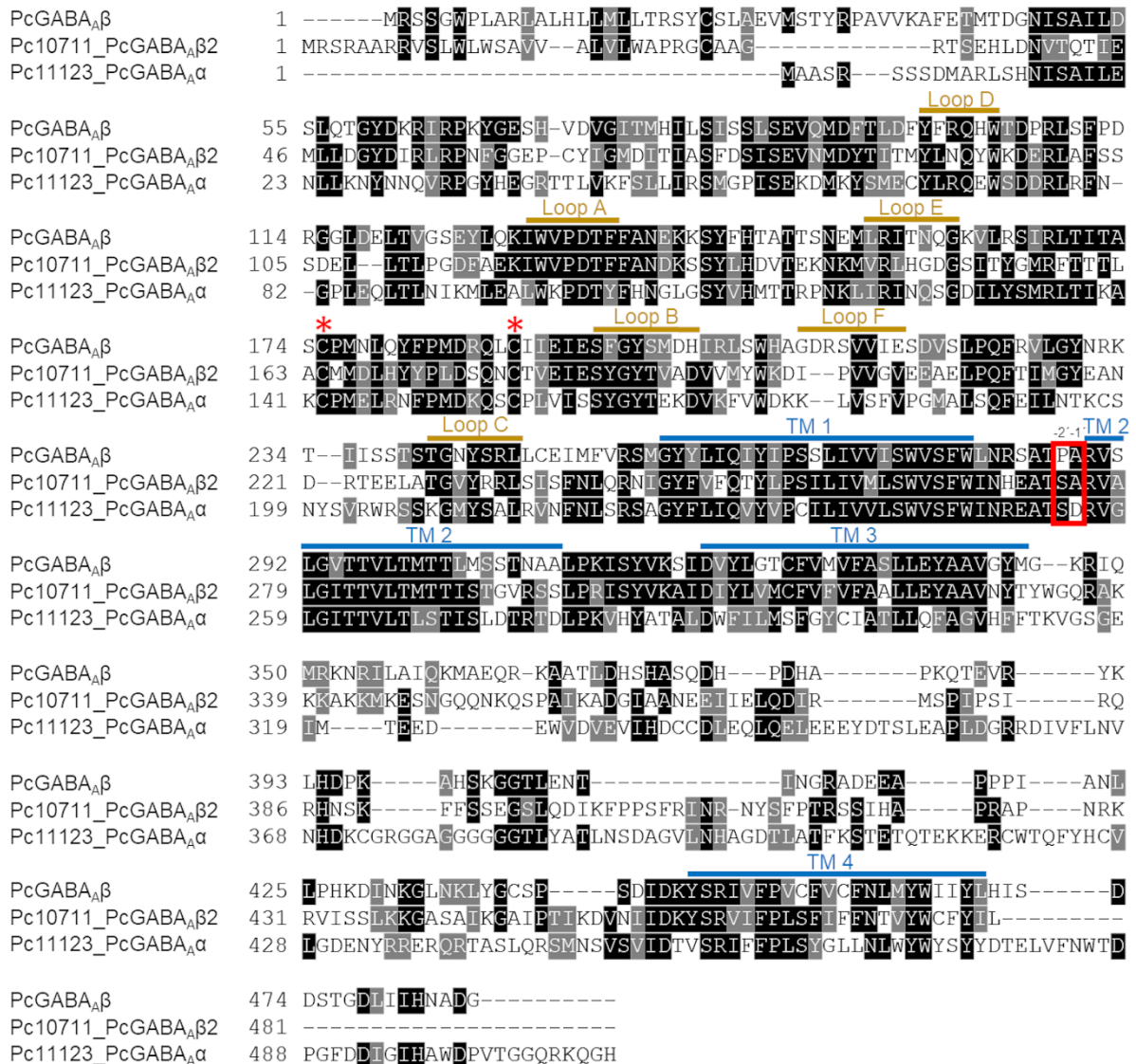


Figura 7. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos predichas para las subunidades PcGABA_A. La secuencia PcGABA_A-β (AKA64699), es comparada con las secuencias PcGABA_A-β2 (OQ446622) y PcGABA_A-α (OQ446623), y se resaltan las características conservadas entre las subunidades de receptores GABA_A. Los aminoácidos conservados son resaltados como idénticos (color negro), o que mantienen su propiedad química (color gris). Las líneas de color café indican las asas involucradas con la unión al ligando (asas A – F). Los asteriscos muestran el par de cisteínas que forman el asa Cys (CX13C). Las líneas azules denotan los segmentos transmembranales (TM1–4). El marco de color rojo encierra a los aminoácidos que contribuyen a la selectividad iónica del receptor. La secuencia PcGABA_A-β2 codifica para una proteína de 481 aminoácidos, mientras que la secuencia PcGABA_A-α codifica para una proteína de 510 aminoácidos.

De manera general, el análisis bioinformático mostró que las secuencias conservan la estructura topológica general, así como varios motivos funcionales asociados a

modificaciones postraduccionales. Los cuatro segmentos transmembranales identificados en PcGABA_A-β2 son: TM1, Y²⁴⁶-I²⁶⁸; TM2, R²⁷⁶-V²⁹⁴; TM3, A³⁰⁶-V³²⁸; y TM4, Y⁴⁵⁹-V⁴⁸⁰ (Figura 8a). Cada segmento transmembranal es conectado por asas intracelulares o extracelulares. Además, la secuencia de aminoácidos de PcGABA_A-β2 tiene dos posibles sitios de *N*-glicosilación (Figura 8b–c), así como 53 sitios posibles de fosforilación (32 sitios para Ser, 15 para Thr y 6 para Tyr), de los cuales 22 sitios se encuentran en aminoácidos presentes en el asa que conecta a los segmentos TM3 con el TM4 (Figura 8d).

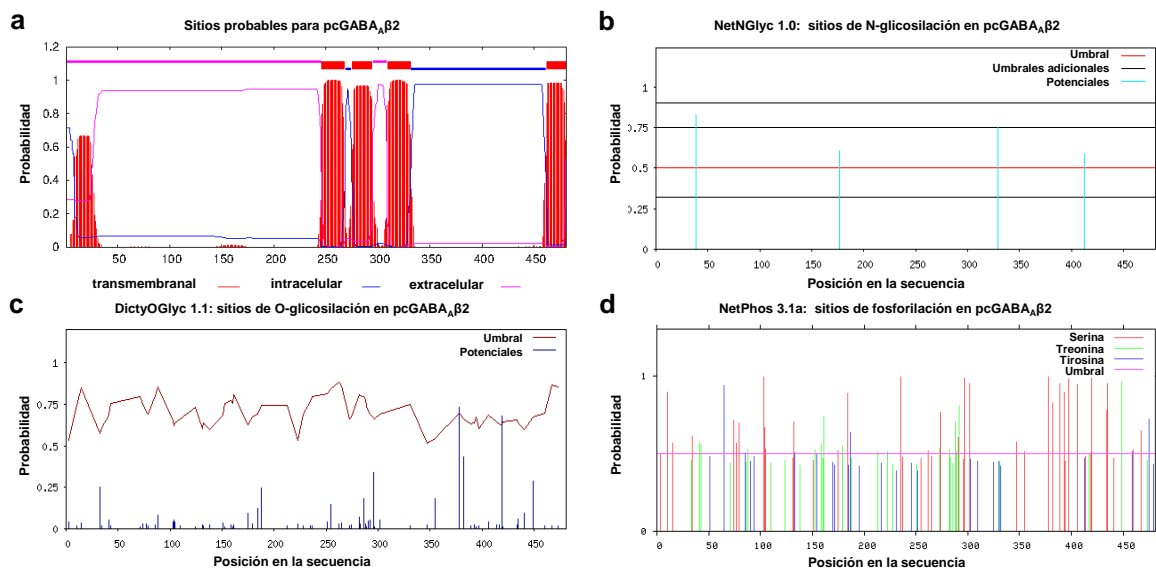


Figura 8. Análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos de PcGABA_A-β2. (a) Topología transmembranal predicha para PcGABA_A-β2, la cual contiene cinco regiones hidrofóbicas (color rojo), en donde los primeros 30 aminoácidos corresponden al péptido señal y las cuatro regiones restantes son los segmentos transmembranales. (b, c) Sitios de glicosilación potenciales para la secuencia PcGABA_A-β2. La secuencia muestra dos posibles sitios para la *N*-glicosilación (b), pero no se encuentran sitios potenciales para la *O*-glicosilación (c). En “d” se muestran los sitios predichos de fosforilación, mostrándose los motivos candidatos para fosforilación en serina, treonina y tirosina para la secuencia PcGABA_A-β2 identificándose con un color diferente para cada tipo de fosforilación. En cada gráfica se muestra una línea horizontal que indica la probabilidad de que el motivo predicho sea funcional, indicándose como “umbral”.

Respecto a la secuencia PcGABA_A-α, también se muestra una topología clásica de subunidades de receptores del asa Cys (TM1, Y²²⁶-I²⁴⁸; TM2, R²⁵⁶-T²⁷⁴; TM3, A²⁸⁶-

V³⁰⁸; TM4, V⁴⁵⁶–Y⁴⁷⁴, Figura 9a) (Möller et al., 2001), con 4 sitios candidatos para *N*-glicosilación y un sitio para la *O*-glicosilación en el extremo amino terminal (Figura 9b–c). Además, la secuencia PcGABA_A-α contiene 58 sitios potenciales de fosforilación (28 sitios para Ser, 22 para Thr, y 8 para Tyr), de los cuales, 26 sitios se encuentran en el asa TM3–TM4 (Figura 9d). Finalmente, utilizando este enfoque bioinformático, se infiere que estas modificaciones postraduccionales podrían estar relacionadas con la función de las nuevas subunidades GABA_A.

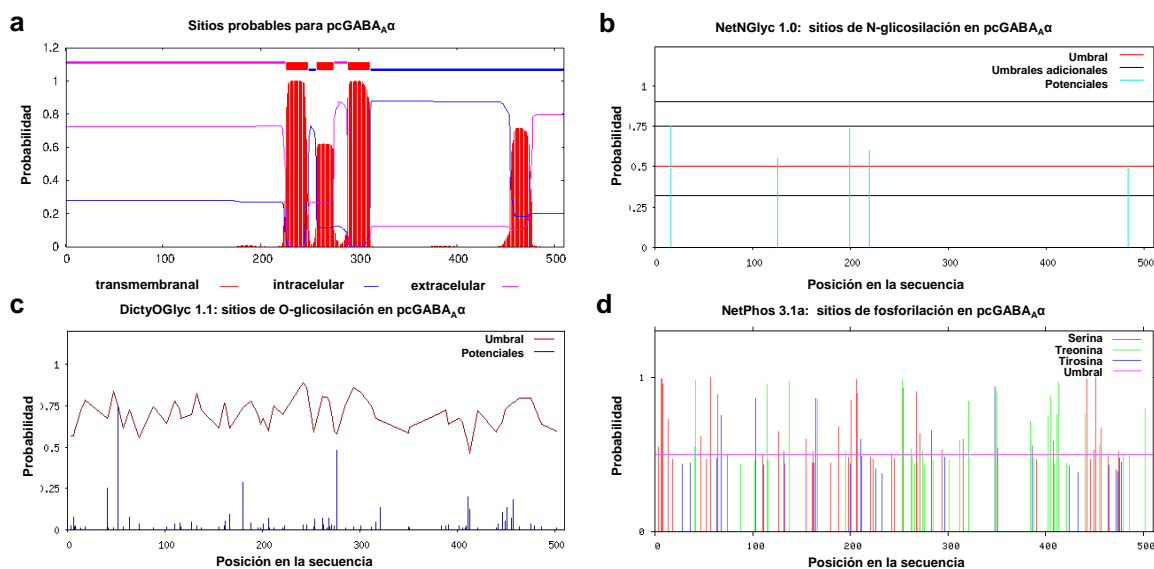


Figura 9. Análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos de PcGABA_A-α. (a) Topología transmembranal predicha para PcGABA_A-α, la cual contiene cuatro regiones hidrofóbicas (color rojo). (b) La predicción de los sitios de glicosilación potenciales para la secuencia PcGABA_A-α muestra tres posibles sitios para la *N*-glicosilación, mientras que solo se encuentra un sitio potencial para la *O*-glicosilación (c). El análisis de predicción de sitios de fosforilación muestra que la secuencia PcGABA_A-α contiene residuos candidatos para fosforilación en serina, treonina y tirosina (d). En cada gráfica se muestra una línea horizontal que indica la probabilidad de que el motivo predicho sea funcional, indicándose como “umbral”.

Análisis de secuencia

Para entender la posible relación que existe entre las secuencias de subunidades de receptores GABA_A de algunos artrópodos, se realizó un alineamiento múltiple y se compararon los motivos funcionales y esenciales que están presentes en las secuencias PcGABA_A-β2 y PcGABA_A-α, con las de algunos invertebrados.

El análisis muestra que la secuencia de aminoácidos de los motivos funcionales como las regiones de unión al GABA, el asa Cys, el asa que conecta a los segmentos TM1–TM2 de PcGABA_A-β2 son muy similares a aquellos que son encontrados en la secuencia DmLCCH3 que proviene de la mosca de la fruta *D. melanogaster* (Figura 10a – c). De manera muy interesante, la secuencia PcGABA_A-α comparte dichas similitudes con la secuencia DmGRD. Es importante resaltar que las secuencias LCCH3 y GRD han sido probadas y son funcionales cuando son evaluadas por expresión heteróloga (Gisselmann et al., 2004). Respecto a la región que confiere la selectividad iónica, el asa que conecta a los segmentos TM1–TM2, se resalta por un cuadro rojo con los números –2 y –1 que indican la posición antes del inicio del TM2, y se muestra que están presentes los aminoácidos Pro y Ala en la secuencia PcGABA_A-β, o bien, una Ser y una Ala en la secuencia PcGABA_A-β2, así como una Ser y un Glu en la secuencia PcGABA_A-α, lo que podría sugerir algunas diferencias en la permeabilidad iónica.

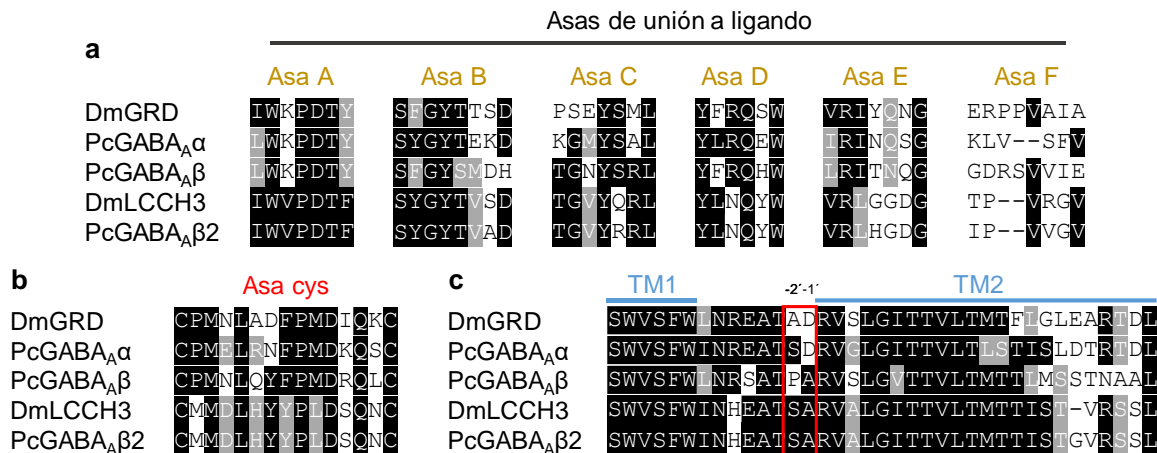


Figura 10. Análisis de secuencia de las subunidades PcGABA_A-β2 y PcGABA_A-α. (a) Las asas A–F forman la cesta de unión para el GABA, localizadas en el extremo amino terminal de las secuencias PcGABA_A. Las regiones presentes en PcGABA_A-β2 son prácticamente idénticas a las mostradas para DmLCCH3 (número de acceso CAA55144), mientras que las regiones presentes en PcGABA_A-α comparten dicha similitud con DmGRD (número de acceso AAB27090). También se compara las asas de unión para el GABA de PcGABA_A-β (AKA64699). (b) Se muestra la secuencia que forma el asa Cys, la cual está conservada entre las subunidades PcGABA_A. (c) Asa intracelular que une a los segmentos TM1–TM2. Los aminoácidos presentes en esta región contribuyen en la

formación del filtro de selectividad. La secuencia de PcGABA_A- α es mucho más similar a la de DmGRD, mientras que la secuencia de PcGABA_A- β 2 es prácticamente idéntica a la de DmLCCH3.

Análisis filogenético

Para determinar la similitud entre las secuencias PcGABA_A con otras subunidades GABA_A, se generó una matriz de identidad basada en el alineamiento con las secuencias de aminoácidos. Dicho análisis mostró que la secuencia PcGABA_A- β 2 tiene un mayor parecido con las secuencias DmLCCH3 y AmLCCH3 (71.82% y 70.29% de identidad, respectivamente), mientras que la secuencia PcGABA_A- α comparte una mayor similitud con las secuencias DmGRD y AmGRD (43.83% y 44.49% de identidad, respectivamente), como se muestra en la Figura 11. De manera interesante, la secuencia PcGABA_A- β mostró un porcentaje de identidad bajo con las otras secuencias PcGABA_A. El porcentaje de identidad de PcGABA_A- β con PcGABA_A- β 2 es del 37.5%, mientras que la identidad compartida con PcGABA_A- α es del 34.7%. Sin embargo, PcGABA_A- β presenta un alto grado de identidad con Ha β 1a de *Homarus americanus* (97.11% de identidad, Figura 11).

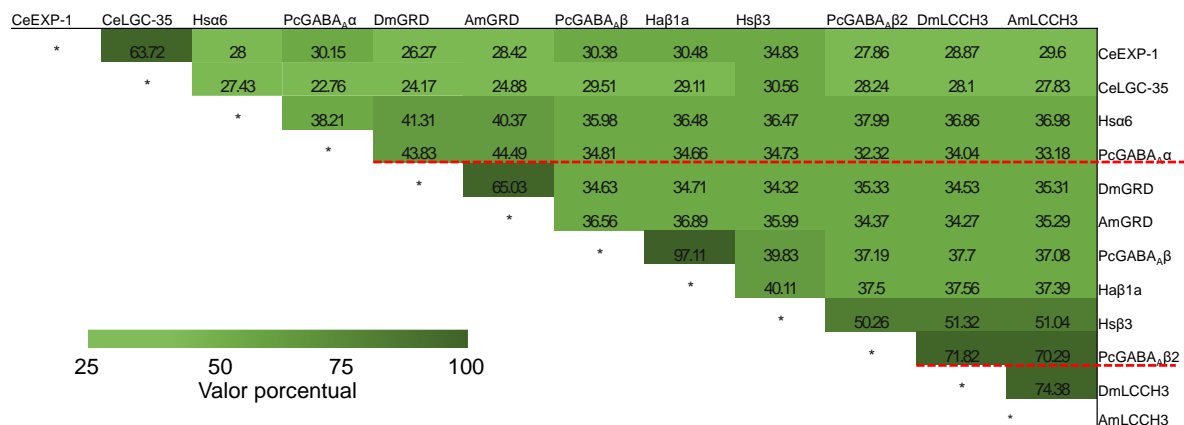


Figura 11. Matriz de identidad entre secuencias de subunidades GABA_AR de invertebrados y vertebrados. Las secuencias DmGRD, DmLCCH3, PcGABA_A- β , PcGABA_A- β 2, y PcGABA_A- α , y también se incluyen para dicho análisis a las secuencias CeEXP-1 (AAQ96595), CeLGC-35 (CAB60369), AmGRD (AJE68942), AmLCCH3 (AJE68943), Ha β 1a (AAM47020), Hs β 3 (AAA52511), y Hs α 6 (AAB36480). Las dos primeras letras pertenecen al nombre de la especie que corresponde cada secuencia. El número e intensidad del color corresponde al porcentaje de identidad entre las secuencias.

De manera adicional, se elaboró un árbol filogenético usando las secuencias de subunidades formadoras de receptores GABA_A, tomadas de vertebrados e invertebrados, para identificar la posible relación evolutiva. Como primer resultado se muestra que la secuencia PcGABA_A-β2 se relaciona con las secuencias AmLCCH3, DmLCCH3, y Hsβ3, mientras que la secuencia PcGABA_A-α se agrupa con las secuencias AmGRD, DmGRD, y Hsα6 (Figura 12). Este análisis permitió clasificar a las subunidades como secuencias similares a subunidades -α o -β.

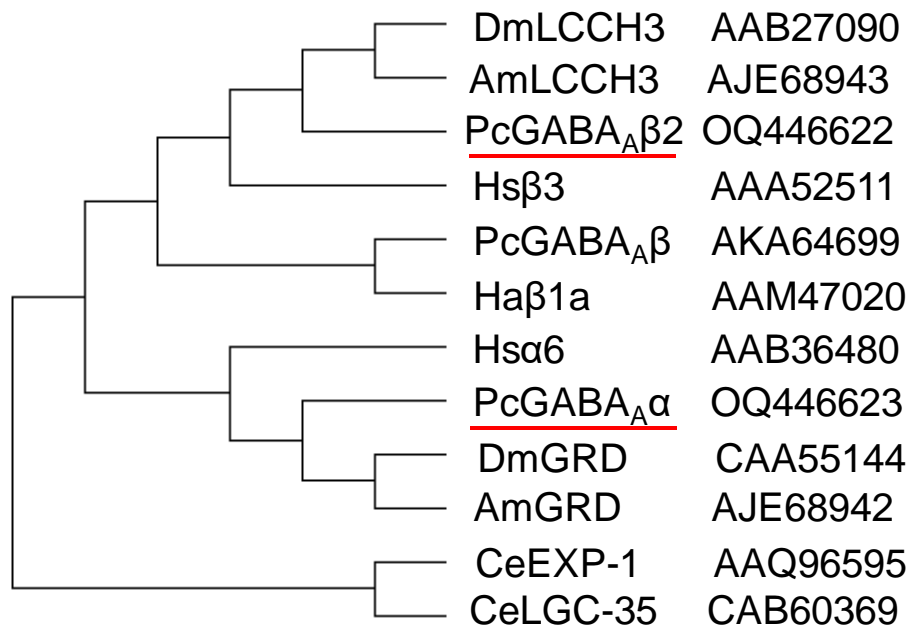


Figura 12. Árbol filogenético de secuencias de subunidades GABA_AR de invertebrados y vertebrados. El análisis incluye las secuencias DmGRD, DmLCCH3, PcGABA_A-β, PcGABA_A-β2, y PcGABA_A-α, así como a las secuencias CeEXP-1 (AAQ96595), CeLGC-35 (CAB60369), AmGRD (AJE68942), AmLCCH3 (AJE68943), Haβ1a (AAM47020), Hsβ3 (AAA52511), y Hsα6 (AAB36480). Las dos primeras letras pertenecen al nombre de la especie que corresponde cada secuencia. El número e intensidad del color corresponde al porcentaje de identidad entre las secuencias. La historia evolutiva de las subunidades GABA_A fue inferida usando el método de Máxima Probabilidad y el modelo de matriz basado en JTT. Los brazos representan las particiones replicadas al menos del 50% de repeticiones que fueron colectadas.

Propiedades de las subunidades PcGABA_A

Para la evaluación funcional de las secuencias PcGABA_A, las células HEK 293T fueron transfectadas ya sea de forma independiente con cada subunidad, o en combinación de dos subunidades (proporción 1:1 en masa) para evaluar si se forman receptores heteroméricos funcionales. Los registros electrofisiológicos fueron realizados por la técnica del “patch-clamp” en la configuración de célula completa, y las respuestas fueron evocadas utilizando el GABA a una concentración final de 100 μ M en la solución de registro. De manera interesante, las subunidades PcGABA_A- β 2 o PcGABA_A- α no evocaron ninguna respuesta, sugiriendo que a diferencia de lo que se sabe para PcGABA_A- β (Figura 13a) (Jiménez-Vázquez et al., 2016), éstas no forman receptores homoméricos funcionales (Figura 13b–c). Los resultados anteriores podrían sugerir que necesitan elementos adicionales para poder formar receptores funcionales. El siguiente paso en la evaluación funcional fue probar si la co-expresión de las subunidades forma receptores funcionales. Cabe resaltar que aún combinando a las subunidades PcGABA_A- β 2 + PcGABA_A- α no logró evocar ninguna respuesta en presencia de GABA (Figura 13d).

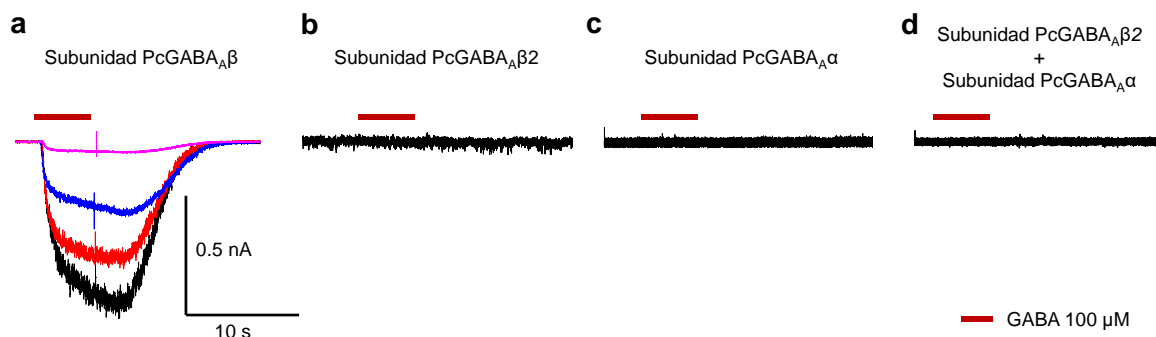


Figura 13. Caracterización funcional de las subunidades formadoras de receptores al GABA de *P. clarkii* expresados en la línea celular HEK 293T. (a) Las corrientes evocadas por la aplicación del GABA (100 μ M); la perfusión del agonista se realizó durante 5 s. La expresión de la subunidad PcGABA_A- β fue utilizada como control de expresión funcional ($n = 15$). (b–c) La expresión de las subunidades PcGABA_A- β 2 y PcGABA_A- α , de manera individual o en combinación fue evaluada, mostrando que no forman receptores homoméricos o heteroméricos funcionales entre dichas subunidades ($n = 10$).

Sin embargo, cuando se co-expresó cualquiera de las subunidades PcGABA_A con la subunidad PcGABA_A-β se obtuvieron respuestas con características únicas, como se ilustra en los trazos adquiridos a distintos potenciales de prueba (Figura 14). Respecto a la respuesta obtenida con la co-expresión de las subunidades PcGABA_A-β2 + PcGABA_A-β, las corrientes muestran un comportamiento muy sostenido (Figura 14a), es decir, se evoca una corriente que no decae a pesar de que el GABA es aplicado solo durante unos segundos. Lo anterior sugiere que el receptor podría no desensibilizarse, aún en ausencia del agonista, siendo dicho comportamiento muy diferente al obtenido con receptores homoméricos PcGABA_A-β (Figura 13a).

Por otro lado, la combinación de las subunidades PcGABA_A-α + PcGABA_A-β mostró corrientes con dos aparentes comportamientos (Figura 14b); por una parte, se observa un componente transitorio que decae aún en presencia del agonista, mientras que el segundo compartimento muestra cierta similitud con las respuestas evocadas por receptores homoméricos de la subunidad PcGABA_A-β, es decir, una corriente sostenida y que decae al lavar el agonista de la solución de registro. Dicho resultado es interesante, ya que sugiere que podrían existir distintos tipos de receptores formados por ambas subunidades, siendo alguno (o algunos), responsable(s) de la respuesta transitoria mientras que otro(s), responsable(s) de la respuesta sostenida (Figura 14b). Los resultados mostrados hasta aquí demuestran que las subunidades PcGABA_A-β2 o PcGABA_A-α no forman receptores homoméricos funcionales, pero la subunidad PcGABA_A-β parece ensamblarse con las otras subunidades para formar receptores hetero-pentaméricos funcionales, ya que se evocan respuestas al ser co-expresadas con dicha subunidad.

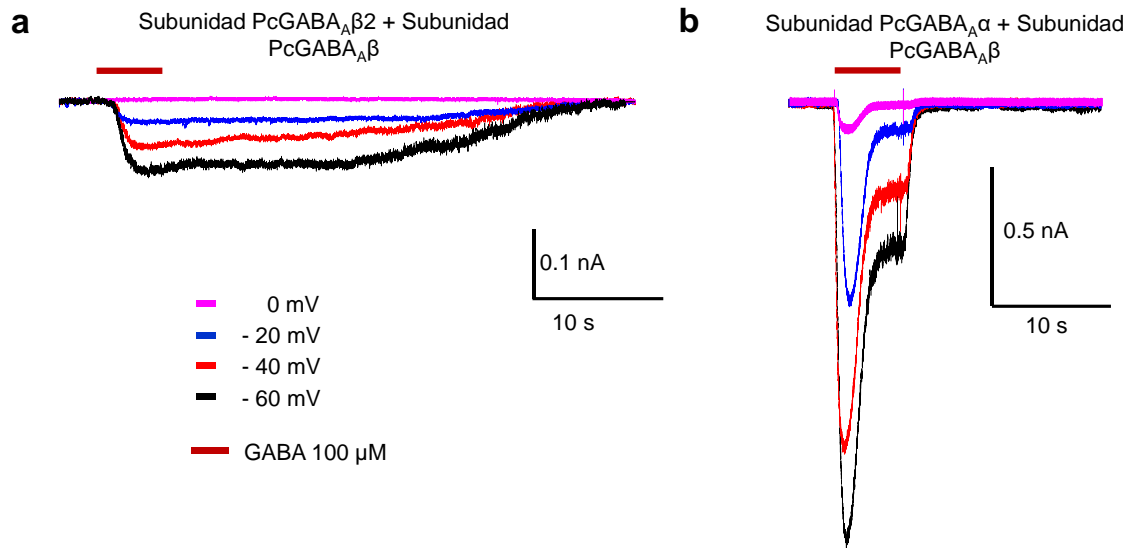


Figura 14. Co-expresión de las subunidades PcGABA_A en la línea celular HEK 293T. En (a) se muestran las corrientes evocadas al co-expresar las subunidades PcGABA_A-β2 + PcGABA_A-β, registradas a distintos potenciales de mantenimiento, observándose corrientes que decaen mucho después del lavado del pulso de GABA (100 μM). En (b) se muestran las corrientes obtenidas al co-expresar las subunidades PcGABA_A-α + PcGABA_A-β, registradas a distintos potenciales de mantenimiento. Se observan corrientes con comportamiento bifásico, en donde las corrientes decaen aún en presencia o poco después del lavado del pulso de GABA.

Estos resultados demuestran que las subunidades PcGABA_A forman receptores funcionales, y cada combinación mostró diferencias en dos características principales: el tiempo a la respuesta máxima y el tiempo del decaimiento completo de la corriente. Se demostró que los receptores heteroméricos PcGABA_A-α + PcGABA_A-β muestran el menor tiempo para la respuesta máxima en comparación con los receptores homoméricos PcGABA_A-β y los receptores heteroméricos PcGABA_A-β2 + PcGABA_A-β. En cuestión al tiempo de decaimiento, se demostró que la combinación PcGABA_A-β2 + PcGABA_A-β mostró el mayor tiempo para la recuperación completa de la corriente, con diferencias significativas con la combinación PcGABA_A-α + PcGABA_A-β.

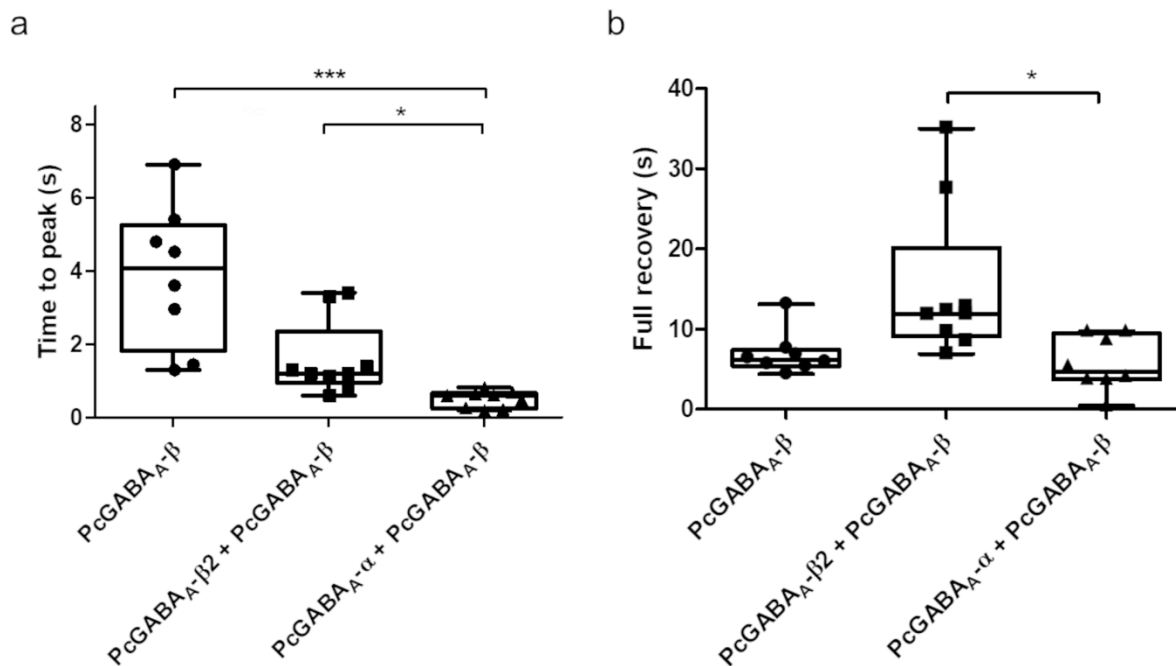


Figura 15. Curso temporal de las respuestas evocadas por GABA con la expresión de las distintas combinaciones de subunidades PcGABA_A en células HEK 293T. (a) Tiempo registrado a la respuesta máxima evocada de las tres combinaciones evaluadas. Los receptores heteroméricos PcGABA_A-α + PcGABA_A-β, muestran el menor tiempo para la respuesta máxima en comparación con los receptores homoméricos PcGABA_A-β y los receptores heteroméricos PcGABA_A-β₂ + PcGABA_A-β. (b) La combinación PcGABA_A-β₂ + PcGABA_A-β mostró el mayor tiempo de recuperación completa, significativamente diferente a la combinación PcGABA_A-α + PcGABA_A-β. La prueba Kruskal – Wallis seguida de la prueba Dunn entre grupos fueron utilizadas para analizar los distintos grupos. *** P<0.0001, ** P<0.001, * P<0.01. Los pulsos de GABA fueron de 5 s, [100 μM].

Debido a que la subunidad PcGABA_A-α contiene en su secuencia aminoácidos que podrían conferir una selectividad catiónica, se evaluó si la combinación PcGABA_A-α + PcGABA_A-β puede formar receptores catiónicos. Por lo anterior, se investigó si la sustitución del ion Na⁺ de la solución de registro afectó la respuesta descrita. En dicho experimento se utilizó al catión no permeable *N*-metil-D-glucamina, y se observó que la corriente transitoria fue afectada drásticamente en las corrientes evocadas por el GABA. Este resultado es sorprendente ya que sugiere que el componente transitorio podría ser resultado de una corriente catiónica, particularmente debida al ion Na⁺. Sin embargo, es importante resaltar que si bien,

la corriente evocada con PcGABA_A- α + PcGABA_A- β fue afectada por la sustitución de Na⁺ extracelular, la respuesta no fue eliminada completamente ya que se mantuvo el componente sostenido, sugiriendo que la naturaleza iónica de esta corriente podría ser debida a otro ion (Figura 16).

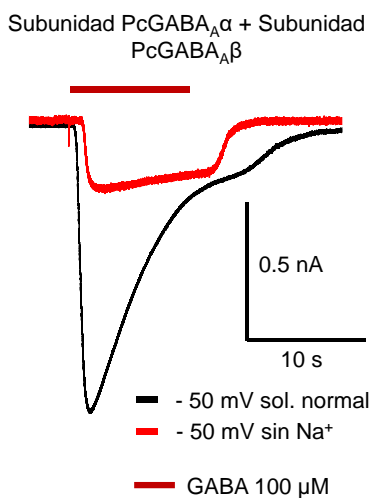


Figura 16. Efecto de la sustitución del Na⁺ extracelular en las corrientes evocadas por el GABA por la co-expresión de las subunidades PcGABA_A- α + PcGABA_A- β . El trazo en negro muestra la corriente evocada con GABA en condiciones salinas normales, observándose una respuesta bifásica, es decir, con un componente transitorio y otro componente sostenido. El trazo en rojo muestra la corriente evocada con GABA, con una solución de perfusión sin Na⁺, y donde se demuestra que la corriente transitoria se afecta drásticamente, pero hay una corriente sostenida remanente. Los trazos fueron obtenidos de la misma célula al potencial de mantenimiento indicado.

Para demostrar la participación del ion Na⁺ en las corrientes evocadas por la combinación de las subunidades PcGABA_A, se realizó una prueba adicional, utilizando dos tipos de soluciones. Primero se registraron las corrientes evocadas con GABA en una solución de cloruro de sodio simétrico (150 mM de NaCl en solución interna y externa), y posteriormente se sustituyó la solución externa por una solución de cloruro de NMDG (150 mM de NMDG-Cl). Se observó que las corrientes evocadas con GABA de los receptores PcGABA_A- α + PcGABA_A- β son transitorias y decaen en presencia del agonista (Figura 17a), y cuando se sustituye el Na⁺ extracelular, la corriente disminuye en amplitud (Figura 17b), lo que

demuestra la importante participación del sodio en las corrientes registradas con dicha combinación. El potencial de equilibrio electroquímico para el sodio en la solución de NaCl es cercano a 0 mV, y se modifica al ser sustituido por NMDG, a un valor cercano a -130 mV. Es importante notar que la sustitución de sodio afecta la magnitud de la corriente, sin embargo, todavía se observa una corriente remanente y que tiene un potencial de inversión cercano a 0 mV, el cual coincide con el potencial de equilibrio para el Cl^- (Figura 17c), que no se modificó. Lo anterior demuestra varios hechos: 1) en la corriente observada en las Figuras 16 y 17a, la participación del sodio es muy importante; 2) al sustituir el Na^+ extracelular se observa una corriente remanente que es debida el ion Cl^- (Figura 17b); y 3) que la combinación de las subunidades $\text{PcGABA}_A\text{-}\alpha + \text{PcGABA}_A\text{-}\beta$ da lugar a la formación de receptores catiónicos y receptores aniónicos.

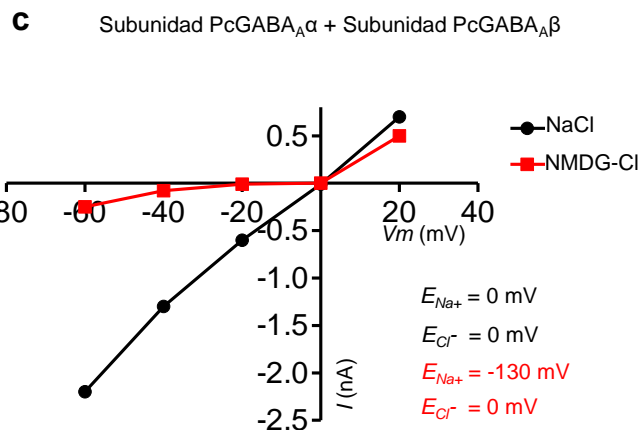
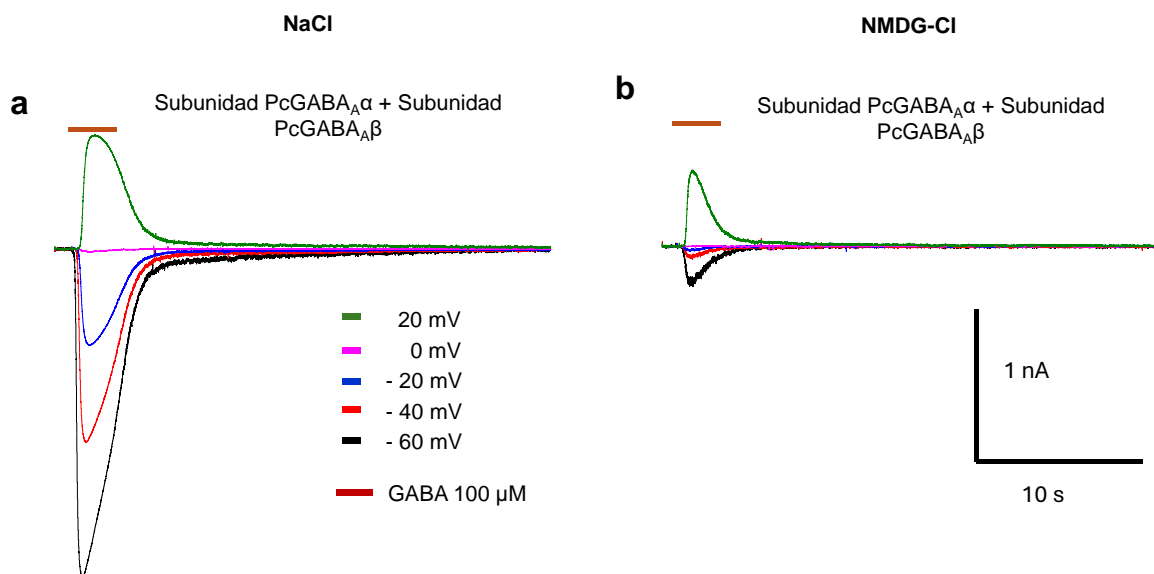


Figura 17. Permeabilidad iónica de los receptores PcGABA_A. En (a) se muestran las corrientes evocadas con 100 μ M de GABA con la combinación PcGABA_A- α + PcGABA_A- β en NaCl simétrico a distintos potenciales de prueba ($n = 9$). En (b) se muestran las corrientes de los receptores PcGABA_A evocadas con GABA en una solución sin Na⁺ externo, donde se manifiesta la participación del catión. En (c) se muestra la relación corriente/voltaje, donde se observa el cambio en el comportamiento de las corrientes en presencia o ausencia de Na⁺, así como la inversión de las corrientes cercano a 0 mV, que coincide con el potencial de equilibrio electroquímico para el Cl⁻.

Por otro lado, con la combinación PcGABA_A- β 2 + PcGABA_A- β se encontró que las corrientes evocadas en presencia de GABA eran sostenidas y decaían varios segundos después del lavado del agonista (Figura 18a). La sustitución del Na⁺ externo no afectó la magnitud o el decaimiento lento de la corriente (Figura 18b), siendo las respuestas observadas muy similares en presencia o ausencia de Na⁺ externo, lo cual sugiere que el ion Cl⁻ es el principal responsable de la corriente macroscópica registrada. La Figura 18c muestra que el potencial de inversión de la corriente, en presencia o ausencia de sodio externo, es cercano a 0 mV, lo cual coincide con el potencial de equilibrio electroquímico calculado para el ion Cl⁻.

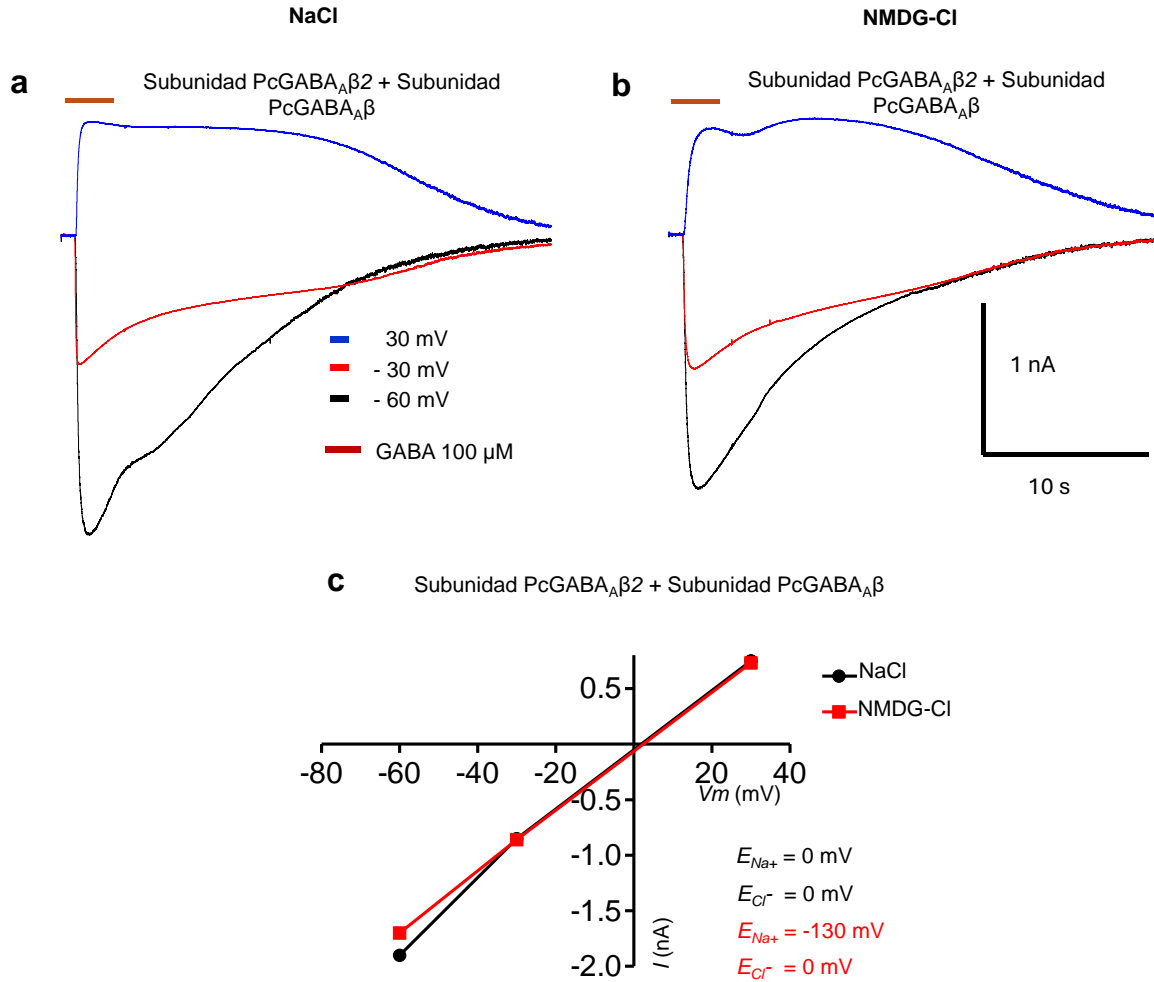


Figura 18. Permeabilidad iónica de los receptores PcGABA_A. En (a) se muestran las corrientes evocadas con 100 μM de GABA con la combinación PcGABA_A-β2 + PcGABA_A-β en NaCl simétrico, a tres distintos potenciales de prueba (n = 8). En (b) se muestran las corrientes evocadas con GABA en una solución sin Na⁺ externo. En (c) se muestra el análisis de potencial de inversión de las corrientes activadas por GABA en presencia (línea negra) o ausencia (línea roja) de Na⁺ externo. Los receptores formados por PcGABA_A-β2 + PcGABA_A-β no mostraron algún cambio en la corriente evocada con GABA en las diferentes condiciones iónicas del registro.

Los resultados obtenidos hasta aquí demuestran que las subunidades PcGABA_A pueden combinarse y formar receptores heteroméricos funcionales. Cada combinación de estas subunidades forma receptores con propiedades funcionales exclusivas, con comportamiento y permeabilidad que parece depender del tipo de subunidad que forme al receptor heteromérico, es decir, si está presente la subunidad PcGABA_A-α, las corrientes pueden ser transitorias y catiónicas, en

contraste, si el receptor contiene a la subunidad PcGABA_A-β2, las corrientes observadas son sostenidas y aniónicas.

Farmacología de los receptores PcGABA_A

Para evaluar las propiedades farmacológicas de los receptores PcGABA_A, se realizaron curvas concentración – respuesta para GABA y muscimol, y para evaluar los efectos de bloqueo de antagonistas, se utilizaron la picrotoxina y la bicuculina en concentraciones de 100 μM. De forma interesante, las combinaciones PcGABA_A-α + PcGABA_A-β y PcGABA_A-β2 + PcGABA_A-β mostraron una sensibilidad muy parecida al GABA (EC₅₀ ~20 μM), y mostraron un coeficiente de Hill (n_H) de 1.9 y 2.1, respectivamente, lo que sugiere una cooperatividad positiva en los sitios de unión para GABA. Respecto al muscimol, la combinación PcGABA_A-α + PcGABA_A-β mostró una EC₅₀ de 33.8 μM, mientras la combinación PcGABA_A-β2 + PcGABA_A-β mostró una EC₅₀ de 44.09 μM. Curiosamente, las respuestas de muscimol de ambos receptores mostraron un n_H cercano a 2, apoyando la idea de una cooperatividad positiva por los sitios de unión al agonista (Figura 19).

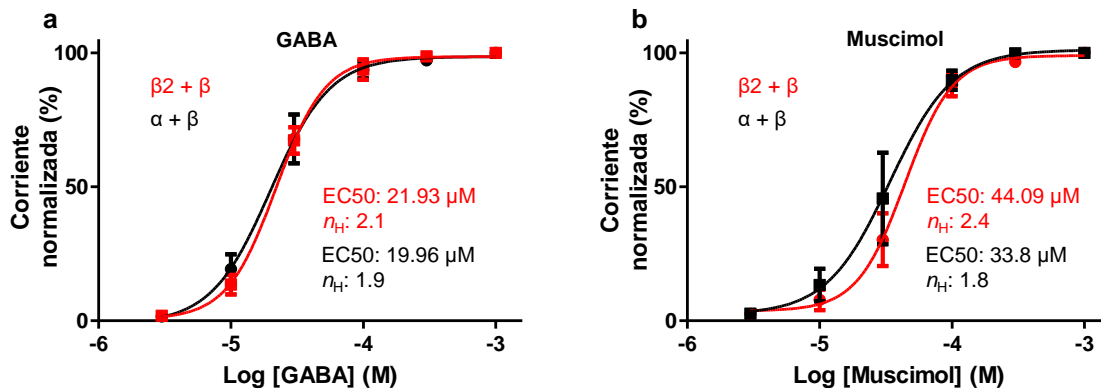


Figura 19. Respuestas farmacológicas de los receptores PcGABA_A. (a–b) muestran las curvas de concentración–respuesta para concentraciones crecientes, mostradas en log₁₀, de los agonistas GABA y muscimol, respectivamente. Las corrientes fueron registradas a –60 mV, y normalizadas a la respuesta máxima (n = 11).

Por otro lado, la Figura 20 muestra el efecto del bloqueador del poro de receptores GABA_A, picrotoxina (PTX), con las combinaciones de subunidades PcGABA_A. Se observa que las corrientes evocadas en presencia de una solución normal son

similares a las descritas previamente (trazos con color negro), sin embargo, la perfusión previa con PTX permite abolir las corrientes evocadas con GABA (trazos en color rojo), demostrando que dicha toxina bloquea a los receptores heteroméricos.

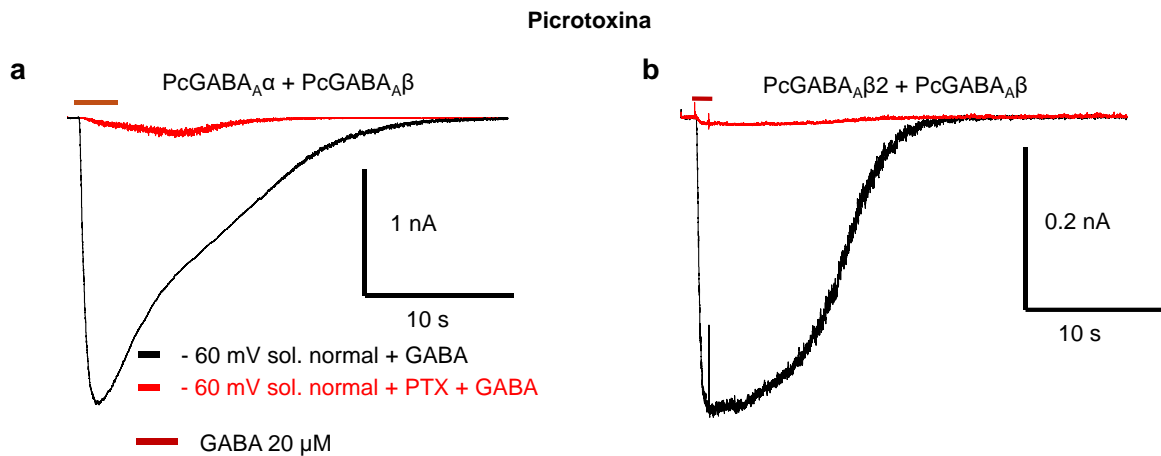


Figura 20. Respuestas farmacológicas de los receptores PcGABA_A. En (a–b) se muestran las corrientes evocadas con GABA y obtenidas a –60 mV en ausencia (trazo negro) o presencia (trazo rojo) de PTX (100 μM). Se observa el bloqueo de la PTX para ambas combinaciones.

En la Figura 21 se muestra el efecto de la bicuculina sobre las respuestas evocadas con las subunidades PcGABA_A; se observa que este fármaco no afecta a las corrientes evocadas por GABA en ninguna combinación (Figura 21a–b).

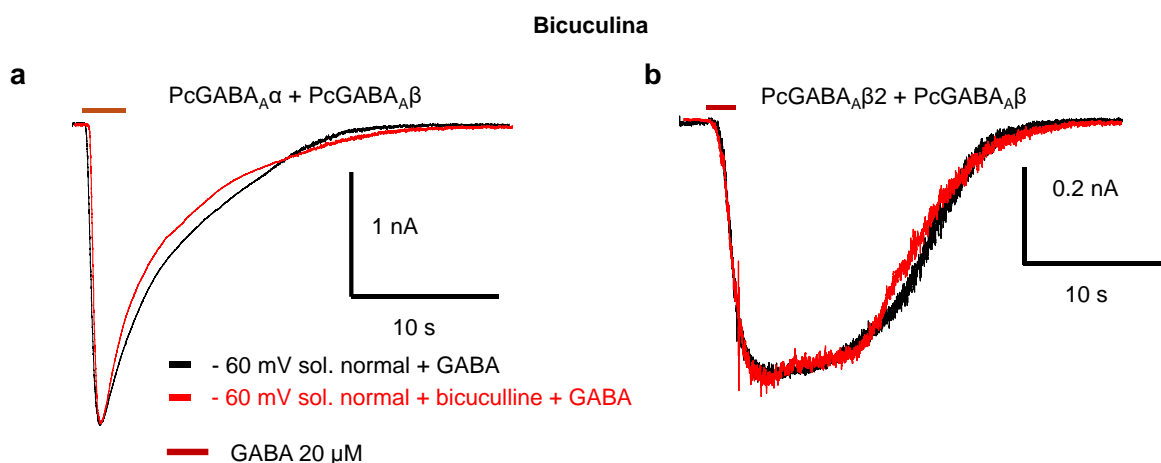


Figura 21. Respuestas farmacológicas de los receptores PcGABA_A. En (a–b) se muestran las corrientes evocadas con GABA, obtenidas a –60 mV en ausencia (trazo negro) o presencia (trazo

rojo) de bicuculina (100 μ M). Se observa que dicho antagonista no afectó las corrientes registradas con las combinaciones PcGABA_A- α + PcGABA_A- β , o PcGABA_A- β 2 + PcGABA_A- β .

Expresión diferencial de las subunidades PcGABA_A

Para identificar el patrón de expresión de las subunidades PcGABA_A, se colectó tejido nervioso de diferentes regiones del tallo ocular del acocil, que incluyó el órgano-X, la *médula terminalis*, la *médula interna*, la *médula externa*, así como los ganglios presentes en todo el tallo ocular. También se colectó tejido muscular tomado de la región abdominal del organismo, para determinar la expresión de estas subunidades en este tejido. Se encontró que la subunidad PcGABA_A- α se expresa exclusivamente en tejido nervioso, mientras que las subunidades PcGABA_A- β 2 y PcGABA_A- β fueron amplificadas tanto de tejido nervioso como de tejido muscular (Figura 22). La amplia expresión de las subunidades en tejidos similares sugiere fuertemente que estas subunidades podrían interactuar entre ellas formando receptores heteroméricos nativos, lo que es consistente con los datos electrofisiológicos reportados en este trabajo. Un hallazgo intrigante es que la amplificación de cada una de las secuencias parece ser muy similar en el órgano-X, apoyando la idea de que estas subunidades forman a los receptores responsables de la respuesta observada y descrita en dichas neuronas (Jiménez-Vázquez et al., 2016).

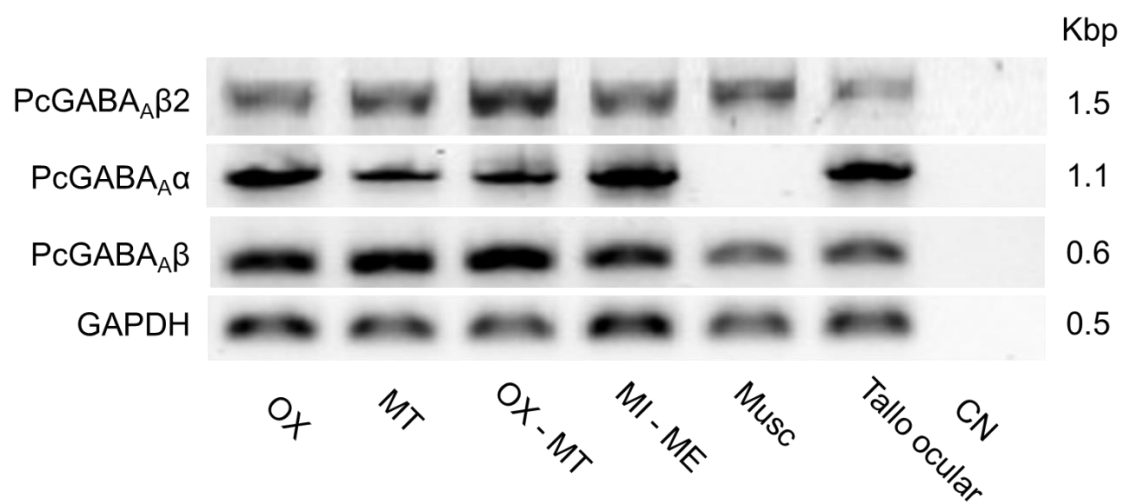


Figura 22. Expresión diferencial de los ARNm codificantes para las subunidades PcGABA_A.

La electroforesis en el gel de agarosa muestra la expresión de las subunidades PcGABA_A en tejido nervioso y muscular de *P. clarkii*. El amplificado para PcGABA_A-β2 (1.5 kpb) se observa en todos los tejidos analizados. Respecto al amplificado para PcGABA_A-α (1.4 kpb) éste se restringe al tejido nervioso. Por otro lado, la secuencia PcGABA_A-β fue abundante tanto en tejido nervioso como en tejido muscular. La amplificación de GAPDH de *P. clarkii* fue utilizado como control de expresión. OX, órgano-X; MT, *Médula terminalis*; OX – MT, órgano-X – *Médula terminalis*; MI – ME, *Médula Interna* – *Médula Externa*; Musc, tejido muscular; Tallo ocular; y CN, control negativo.

Fluorescencia por hibridación *in situ*

La expresión del ARNm de las subunidades PcGABA_A fue confirmada con el uso de ribosondas antisentido, marcadas con digoxigenina (dig-labeled), para el ARNm de cada secuencia (PcGABA_A-α y PcGABA_A-β2). La detección se realizó en neuronas del órgano-X, así como en la retina del acocil. En la Figura 23a se muestra la señal de hibridación de la ribosonda antisentido para PcGABA_A-α, detectándose en la región perinuclear y citoplasmática de las células fotorreceptoras (ph). También se detecta una intensa señal de hibridación en la membrana basal (bm), así como en la *lámina ganglionaris* (lg), lo que sugiere que la expresión de esta subunidad en estas regiones puede tener un papel importante. En la Figura 23b se muestra la señal de fondo obtenida con la ribosonda en sentido, en donde no se observa una señal evidente. Adicionalmente, se observó que la ribosonda antisentido se hibridó ampliamente en las neuronas del órgano-X (Figura 23c), en la región perinuclear y citoplasmática, lo que apoya la idea de que esta subunidad puede formar receptores funcionales en estas neuronas, en combinación con la expresión de la secuencia PcGABA_A-β, reportada previamente (Jiménez-Vázquez et al., 2016).

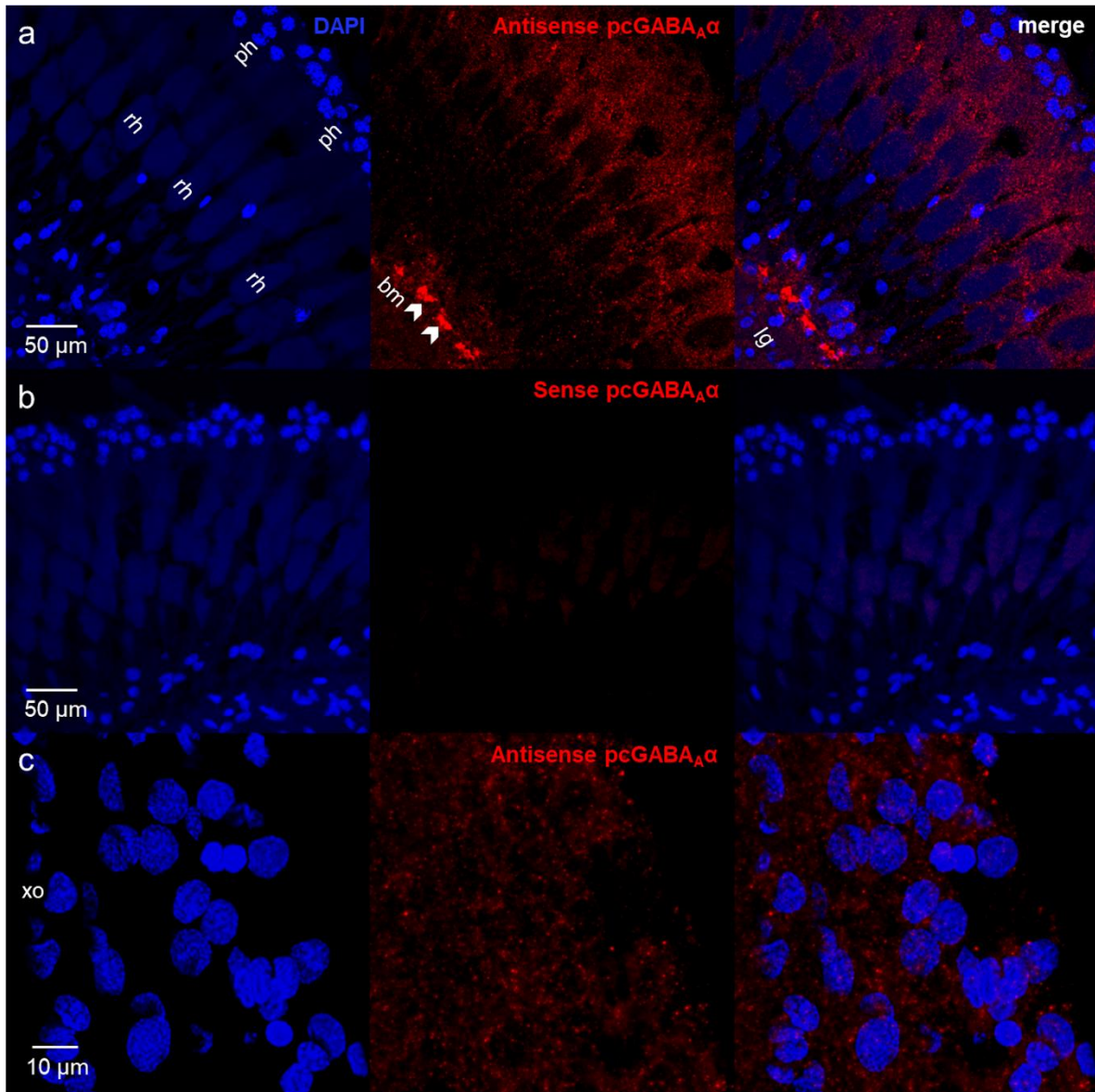


Figura 23. Expresión regional de la subunidad PcGABA_A-α en la retina y en el órgano-X. (a) Fluorescencia de la hibridación *in situ* con la ribosonda antisentido para PcGABA_A-α, donde se muestra una amplia expresión del ARNm en los fotorreceptores (ph), localizada en el citoplasma, pero excluida de los rabdomos (rh), (que corresponde a la parte central de cada omatidio, que tiene forma de huso). También se observa la intensa expresión de esta subunidad en la membrana basal (bm, flechas blancas). En esta región están localizadas las células “pie”, que proveen de estabilidad mecánica en la retina, siendo consideradas como células gliales (Krebs, 1972). Además, se observa la señal de la ribosonda antisentido de PcGABA_A-α en la *lámina ganglionaris* (lg), que forma parte del tallo ocular. En (b) se muestra el control negativo de la hibridación *in situ* con la ribosonda sentido para PcGABA_A-α. (c) Fluorescencia de la ribosonda antisentido de PcGABA_A-α en las neuronas del

órgano-X (ox), donde la expresión de esta subunidad se restringe a la región perinuclear y citoplásmica.

Respecto a la subunidad PcGABA_A-β₂, la ribosonda antisentido también fue detectada en las células fotorreceptoras, en la membrana basal y en la *lamina ganglionaris* (Figura 24a). De manera similar, la ribosonda en sentido para la secuencia PcGABA_A-β₂ no fue detectada, ya que no se observó ninguna marca específica. (Figura 24b). Finalmente, la señal para PcGABA_A-β₂ fue detectada por la ribosonda antisentido en las neuronas del órgano-X (Figura 24c), demostrándose que se expresa en estas células con una intensidad similar a lo observado con las secuencias PcGABA_A-α y PcGABA_A-β. En conjunto, todos estos resultados apoyan el hecho de que las subunidades se pueden combinar para formar receptores heteroméricos.

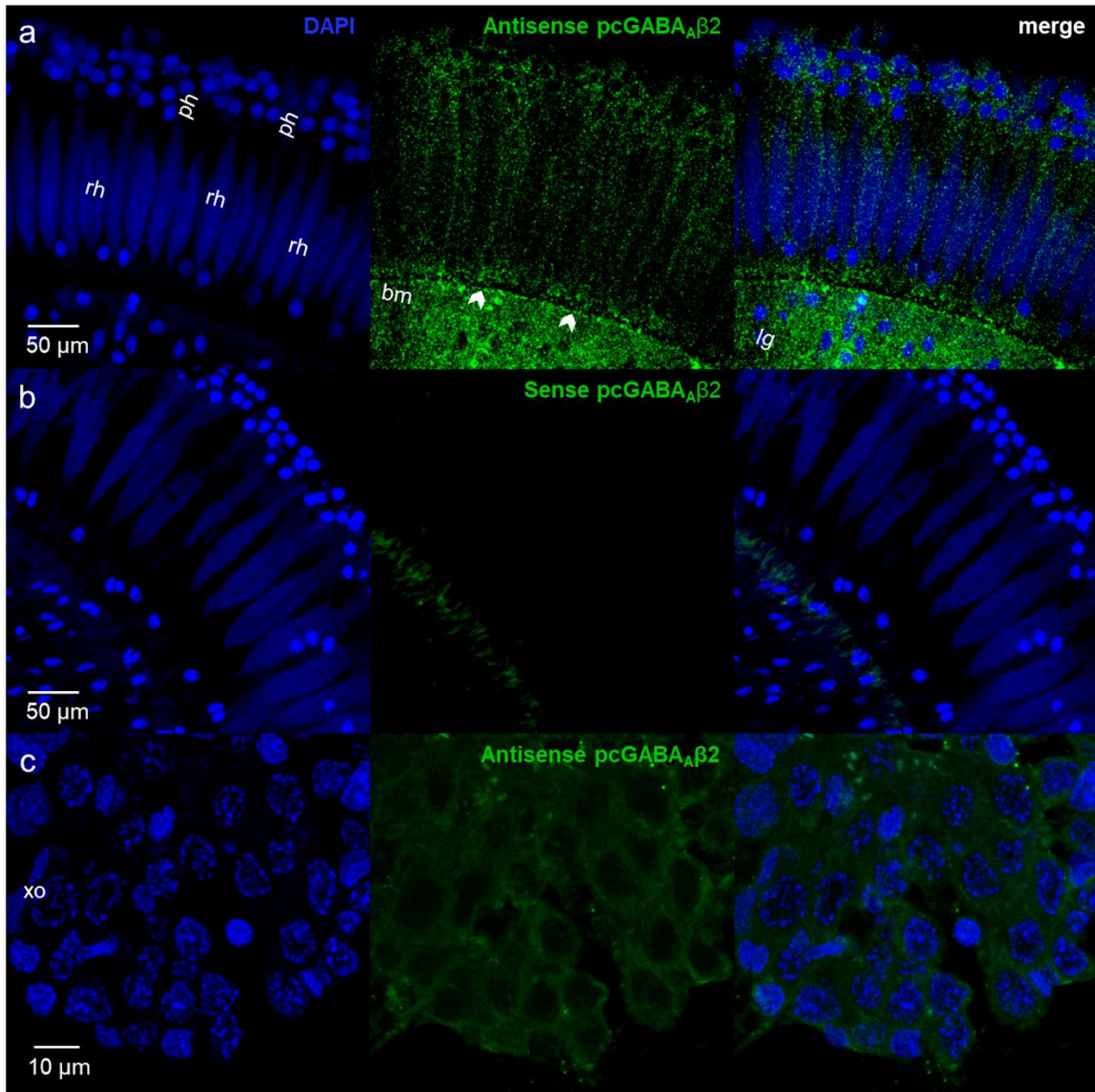


Figura 24. Expresión regional de la subunidad PcGABA_A-β₂ en la retina y en el órgano-X. (a) Fluorescencia de la hibridación *in situ* con la ribosonda antisentido para PcGABA_A-β₂, donde se muestra una señal en el citoplasma y axones de los fotorreceptores (ph), pero excluida de los rabdómos (rh). También se observa la señal en la membrana basal (bm, flechas blancas), donde la terminal de los fotorreceptores interactúa con las células monopolares de la *lamina ganglionaris* (lg). (b) Se muestra el control negativo de la hibridación *in situ* con la ribosonda en sentido para PcGABA_A-β₂. Nótese que al nivel de la *lamina ganglionaris* se detecta una fluorescencia nativa. (c) Fluorescencia de la hibridación *in situ* con la ribosonda antisentido de PcGABA_A-β₂ en las neuronas del órgano-X (ox), donde la expresión de esta subunidad se restringe a la región perinuclear y citoplásmica.

Papel funcional del receptor al GABA catiónico

Los experimentos anteriores demuestran la existencia de un receptor activado por GABA con selectividad catiónica conformado por dos subunidades, las subunidades PcGABA_A- α y PcGABA_A- β 2. Aunque todavía no es clara la estequiometría o arreglo espacial de este receptor, se comprobó que estas subunidades son expresadas tanto en el órgano X, como en otros grupos neuronales que se encuentran en el tallo ocular del organismo. Algunos datos obtenidos en el laboratorio mostraron que a concentraciones bajas del GABA (1 μ M), las neuronas muestran un aumento en la excitabilidad celular, mientras que a altas concentraciones (20 μ M), predomina el papel inhibitor del neurotransmisor (datos no publicados). Este fenómeno podría estar relacionado con cambios en la concentración de GABA en la hemolinfa, registrados de manera circadiana. De manera interesante, el soma de las neuronas del órgano X es la región que está en contacto con la hemolinfa y, por lo tanto, podría ser la zona en la que los cambios en la concentración de GABA pueden modular la actividad eléctrica de estas neuronas (Garduño et al., 2002). Para demostrar el papel del GABA sobre el soma de las neuronas del órgano X, se realizó una prueba experimental en la que se fijó el tallo ocular en una cámara de registro y se perfundió con solución Van Harreveld (VH) normal, y se colocó un electrodo intracelular en el soma de una neurona del órgano X (Figura 25a). En dicho experimento se observó que en una condición control la neurona tiene actividad eléctrica espontánea, sin embargo, al aplicar 1 μ M del GABA (con un micro-aplicador justo en la región periférica del órgano X), se produjo un aumento en la generación de potenciales de acción (Figura 25b). Estos datos muestran que la perfusión del GABA en el soma de las neuronas del órgano X producen un aumento en la excitabilidad celular, fenómeno que podría ser explicado por la activación de receptores activado por el GABA con selectividad catiónica localizados en esta región.

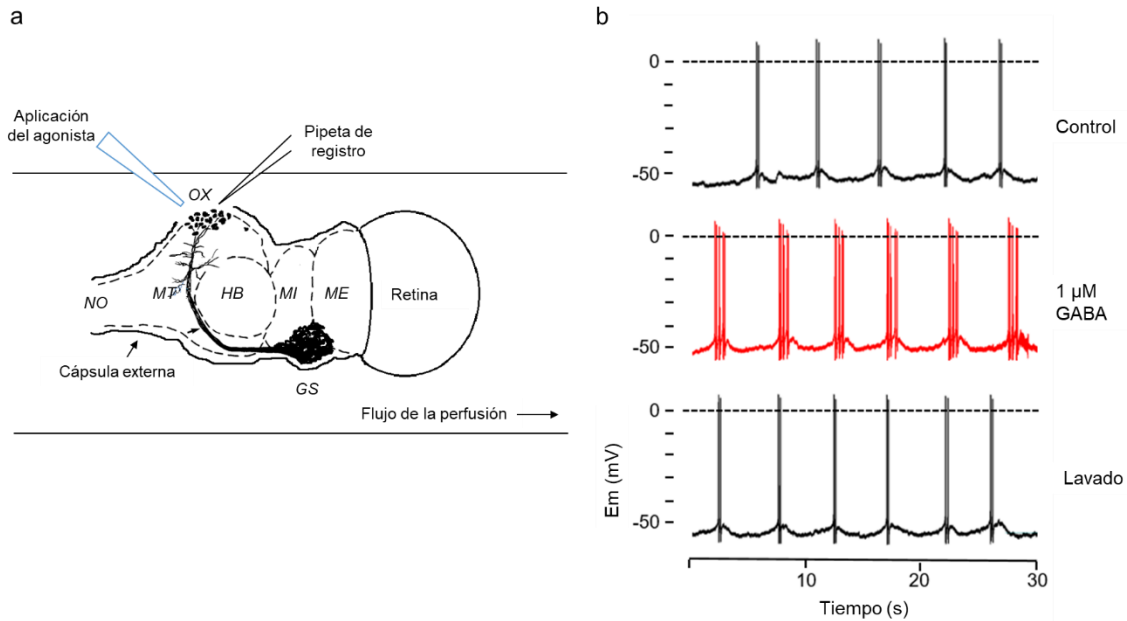


Figura 25. Efecto del GABA aplicado directamente sobre el soma de neuronas del órgano-X.

(a) Esquema del tallo ocular en una cámara de registro en donde se realizó el registro intracelular de una neurona del órgano-X en ausencia y presencia del GABA en la solución de registro. (b) Registro intracelular en condición de fijación de corriente de una neurona del órgano-X, donde se muestran cambios en la excitabilidad celular tras la aplicación de 1 μM de GABA, asociada al aumento en la generación de potenciales de acción.

En resumen, los resultados mostrados en este trabajo indican que las subunidades PcGABA $_{\alpha}$ y PcGABA $_{\beta 2}$ tienen similitudes estructurales y funcionales tanto con PcGABA $_{\beta}$, como con otros miembros de la superfamilia de receptores-canales pentaméricos activados por ligando (pLGIC) o de la familia del asa Cys. También aumentan el número de subunidades de receptores GABA $_{\text{A}}$ conocidas del acocil, y contribuyen a un mejor entendimiento de cómo el GABA desempeña diferentes respuestas en un mismo grupo neuronal.

DISCUSIÓN

En este trabajo se clonó y evaluó la expresión funcional de dos nuevas secuencias de subunidades formadoras de receptores GABA_A del acocil *P. clarkii*, nombradas PcGABA_A- α y PcGABA_A- β 2. Los péptidos deducidos de dichas secuencias comparten características estructurales y propiedades funcionales con las de los receptores GABA_A reportadas de otros invertebrados y vertebrados (Beg and Jorgensen, 2003; Bormann, 2000; Gisselmann et al., 2004; Henry et al., 2020; Jobson et al., 2015; Knipple & Soderlund, 2010). El análisis bioinformático predice que las secuencias codifican para proteínas cuya longitud está entre 480 a 510 aminoácidos, con una estructura topológica de cuatro segmentos transmembranales, con sitios de glicosilación en el dominio amino extracelular que podrían regular la expresión funcional de este tipo de subunidades (Barnard et al., 2008; Henderson et al., 1993). Adicionalmente, se encontraron algunos sitios potenciales de fosforilación que están presentes en el asa que conecta a los segmentos TM3–TM4, los cuales podrían regular la actividad del receptor desde el interior celular (Thompson et al., 2010).

El análisis de secuencia mostró que las subunidades PcGABA_A están relacionadas con subunidades reportadas en algunas especies de insectos (Gisselmann et al., 2004; Hashim et al., 2022; Henry et al., 2020). De manera interesante, el análisis filogenético reveló que hay un gran porcentaje de identidad entre la secuencia PcGABA_A- β 2 y las secuencias de insecto DmLCCH3 y AmLCCH3, que oscila entre 70–72%, mientras que la subunidad PcGABA_A- α comparte una gran identidad con las subunidades DmGRD y AmGRD, cuyo intervalo fluctúa del 43–45 %. Dicha identidad entre secuencias está asociada a la presencia de los principales motivos funcionales y altamente conservados (el asa Cys, los sitios de unión para el agonista, la secuencia de los segmentos transmembranales, y la región del filtro de selectividad) (Pearson, 2013), lo que sugiere que las subunidades del acocil son homólogas a las secuencias reportadas en los insectos. De manera adicional, la identidad molecular conservada entre estas secuencias indica que todas estas subunidades podrían estar relacionadas por un ancestro común, y las regiones conservadas se mantienen a causa de funciones moleculares cruciales (por

ejemplo, conservar la afinidad para el ligando, mantener la estructura topológica general y poseer una selectividad iónica exclusiva). Es interesante reconocer que las diferencias moleculares entre las secuencias comparadas podrían estar relacionadas con las funciones particulares de cada proteína, resaltando la importancia de entender la asociación entre la estructura y la función de cada proteína (Thompson et al., 2010). Respecto a este último punto, las principales (pero no únicas) diferencias moleculares se encuentran en las asas que conectan a los segmentos transmembranales, principalmente en el asa intracelular TM3–TM4, la cuál es la de mayor longitud en estas proteínas. Esta región es muy diversa, y su función principal está asociada al control de la actividad del canal iónico mediante mecanismos de señalización intracelular (Macdonald & Botzoulakis, 2010).

Tomando en cuenta lo anterior, se puede sugerir que las secuencias PcGABA_A son homólogas a secuencias GABA_A de insecto, es decir, que la secuencia PcGABA_A-β₂ es homóloga a las secuencias LCCH3, mientras que la secuencia PcGABA_A-α es homóloga a las secuencias GRD, reportada en *D. melanogaster*, así como en otros insectos (Gisselmann et al., 2004; Ménard et al., 2018; Henry et al., 2020; Hashim et al., 2022). Cabe mencionar que la secuencia PcGABA_A-β (Jiménez-Vázquez et al., 2016), también muestra gran identidad y puede ser considerada como homóloga a la subunidad de receptores resistentes a la dieldrina RDL (P25123) de *D. melanogaster*, la cual también forma receptores homoméricos funcionales con selectividad al cloruro (Dupuis et al., 2010; Millar et al., 1994). En resumen, se puede considerar que las secuencias PcGABA_A son homólogas a las reportadas en algunos insectos.

Lo que se ha descrito para los receptores pentaméricos activados por ligando (pLGIC), de la superfamilia del asa Cys, es que se necesita de la oligomerización de cinco subunidades para formar un canal iónico, y que puede ser formado por subunidades del mismo tipo o subunidades diferentes en el arreglo pentamérico, localizándose el filtro de selectividad por los aminoácidos que se encuentran en el TM2, particularmente los que se orientan hacia el interior celular en la posición –2 y –1 (Keramidas et al., 2004). En esta región, la subunidad PcGABA_A-β contiene una

Pro y una Ala, formando receptores pentaméricos con selectividad aniónica, como se ha descrito también para DmRDL (Chen et al., 1994; Millar et al., 1994; Dupuis et al., 2010; Ménard et al., 2018). Respecto a la subunidad PcGABA_A-β₂, esta región del filtro de selectividad es muy similar al de las subunidades LCCH3, donde se presenta una Ser y una Ala, sin embargo, parece que esta subunidad puede formar receptores aniónicos o catiónicos, dependiendo de la subunidad con la que se co-exprese (Dupuis et al., 2010; Gisselmann et al., 2004; Hashim et al., 2022; Henry et al., 2020). De forma interesante, las subunidades LCCH3 o la subunidad PcGABA_A-β₂ no pueden formar receptores homoméricos funcionales, y parecen necesitar de otras subunidades para formar un receptor heteromérico funcional. Por otro lado, la subunidad PcGABA_A-α, así como se ha descrito para las subunidades GRD, presenta en la región del poro los aminoácidos Ser y Glu. Se ha demostrado que dichos aminoácidos contribuyen en conferir selectividad catiónica, sin embargo, es necesario que las subunidades GRD se combinen con LCCH3 para formar receptores funcionales (Gisselmann et al., 2004; Hashim et al., 2022; Henry et al., 2020; Ménard et al., 2018). Curiosamente, tampoco la subunidad PcGABA_A-α es capaz de formar receptores homoméricos funcionales, y fue necesaria la co-expresión con otra subunidad para detectarse respuestas evocadas por GABA; sin embargo, todavía no es claro cómo es que algunas subunidades pueden formar receptores homoméricos funcionales o cómo es que algunas subunidades necesitan co-ensamblarse con otras para formar un receptor heteromérico funcional. Una posible explicación podría estar asociada a la activación del receptor y, en particular, con la unión de agonista en la cesta de unión del ligando.

Recientemente se ha demostrado que en las asas de unión para el GABA hay siete aminoácidos que son críticos para la interacción con el GABA en su estado de zwitterión (Ashby et al., 2012; Comitani et al., 2016; Ménard et al., 2018). Estos siete aminoácidos están presentes en las subunidades PcGABA_A-β y DmRDL (Y99, R101, F136, S166, E194, F196 and Y244 encontrados en PcGABA_A-β; Y109, R111, F146, S176, E204, F206, and Y254 en DmRDL), y podrían explicar por qué estos receptores homoméricos pueden ser funcionales al ser activados con GABA. Por lo

tanto, la presencia de estos aminoácidos parece conferir la capacidad de unir apropiadamente el neurotransmisor al receptor, y como consecuencia, la activación del receptor homomérico. Las subunidades PcGABA_A-β2 y PcGABA_A-α conservan solo cuatro de los siete aminoácidos (en negritas los aminoácidos conservados: **Y90**, N92, **F125**, G155; **E183**, Y185, y **Y231** en PcGABA_A-β2; **Y68**, **R70**, Y103, **S224**, S161, Y163 y **Y210** en PcGABA_A-α) lo que podría sugerir una interacción parcial con el agonista, y por lo tanto, no permitir la activación de un receptor formado por una misma subunidad, como se ha observado con la expresión individual de las subunidades GRD y LCCH3 (Ashby et al., 2012; Comitani et al., 2016; Henry et al., 2020a). Sin embargo, la co-expresión de las subunidades GRD y LCCH3 permite la formación de receptores heteroméricos funcionales, lo que sugiere que hay una cesta de unión funcional para que el GABA permita la activación y función del receptor (Gisselmann et al., 2004; Hashim et al., 2022; Henry et al., 2020).

Debido a que las subunidades PcGABA_A-β2 y PcGABA_A-α parecen ser homólogas a las subunidades LCCH3 y GRD de insectos, respectivamente, se supondría que la combinación de las subunidades del acocil formaría receptores funcionales cuando son co-expresadas, sin embargo, no ocurrió de esa manera. Lo anterior sugiere que podrían necesitarse de componentes celulares o subunidades adicionales para restaurar la funcionalidad de un receptor formado por las subunidades PcGABA_A-β2 y PcGABA_A-α. Adicionalmente, dado que las subunidades evaluadas son clonadas a partir de un crustáceo y que fueron evaluadas en una línea celular de humano, se considera que podría haber factores críticos que estén presentes en el sistema nativo y que estén ausentes en la línea celular de humano (Frommer & Ninnemann, 1995). Fue sorprendente que cuando las subunidades PcGABA_A-β2 o PcGABA_A-α son co-expresadas con la subunidad PcGABA_A-β, se evocan respuestas por el GABA, lo que muestra que se forman receptores heteroméricos funcionales, y que cada combinación posee propiedades únicas y diferentes a lo reportado para receptores homoméricos PcGABA_A-β (Jiménez-Vázquez et al., 2016)

Se observó que con la co-expresión de las subunidades PcGABA_A-β2 + PcGABA_A-β se evocan respuestas dependientes del GABA, y que el comportamiento de la corriente tiene un decaimiento lento, es decir, la corriente se mantiene varios segundos después de que se removió el agonista. Una posible explicación para esto es que el GABA podría quedar unido a la cesta de unión del receptor heteromérico, permitiendo que el poro del canal permanezca abierto, resultando en una corriente sostenida. Además, para demostrar que el receptor heteromérico PcGABA_A-β2 + PcGABA_A-β permea una corriente aniónica, se evaluó el comportamiento de dicha corriente en presencia o ausencia de Na⁺ externo. Como se esperaba, la corriente sostenida no se modificó, lo cual es consistente para lo reportado con las subunidades homólogas LCCH3 + RDL de *D. melanogaster*, así como lo reportado para *A. mellifera* (Dupuis *et al.*, 2010; Henry *et al.*, 2020).

De manera sorprendente, en este trabajo se encontró una corriente catiónica dependiente de GABA, obtenida de la co-expresión de las subunidades PcGABA_A-α y PcGABA_A-β. Las corrientes evocadas por el GABA tuvieron dos comportamientos importantes, el primero fue un componente transitorio y el segundo un componente sostenido. Una posible explicación para las respuestas evocadas es que posiblemente las subunidades PcGABA_A-α + PcGABA_A-β pueden formar más de un tipo de receptores heteroméricos, sin olvidar que la subunidad PcGABA_A-β puede formar receptores homoméricos funcionales (Jiménez-Vázquez *et al.*, 2016). Considerando que la subunidad PcGABA_A-α contiene algunos aminoácidos que podrían conferir una selectividad catiónica, se evaluó la dependencia al Na⁺ de las corrientes descritas, sustituyendo al Na⁺ de la solución de registro por el catión NMDG⁺. De manera sorprendente, la corriente transitoria fue drásticamente reducida al sustituir el sodio, lo que demuestra que hay un receptor heteromérico formado por las subunidades PcGABA_A-α + PcGABA_A-β que permea una corriente de Na⁺. Sin embargo, en la condición sin Na⁺ todavía se puede observar una corriente “remanente”. Esta corriente residual tiene un potencial de inversión muy cercano al potencial de equilibrio predicho para el ion Cl⁻, sugiriendo que se trata de una corriente aniónica. Es interesante reconocer que también se

puede observar una corriente transitoria residual en ausencia de Na^+ , que se invierte cerca del E_{Cl^-} , es decir 0 mV, y que no se puede explicar por el ensamble de receptores homoméricos $\text{PcGABA}_{\text{A}}\text{-}\beta$, sino que más bien podría ser explicada por una pequeña población de receptores heteroméricos $\text{PcGABA}_{\text{A}}\text{-}\alpha + \text{PcGABA}_{\text{A}}\text{-}\beta$, con una estequiometría y arreglo espacial que permite la formación de un receptor heteromérico de tipo aniónico. Algunos hallazgos similares fueron descritos por las subunidades homólogas GRD y RDL, respectivamente, reportadas del piojo humano y de la abeja común (Hashim et al., 2022; Henry et al., 2020), en donde dichas subunidades forman receptores heteroméricos con selectividad catiónica. Por lo tanto, es importante resaltar que si bien la subunidad $\text{PcGABA}_{\text{A}}\text{-}\beta$ puede formar receptores homoméricos de tipo aniónico, la co-expresión con la subunidad $\text{PcGABA}_{\text{A}}\text{-}\alpha$ permite formar receptores heteroméricos funcionales, resaltando aquellos que tienen una selectividad catiónica. Dicha selectividad es atribuida a la naturaleza química de los aminoácidos presentes en las posiciones -2 y -1 del TM2 (Gurley et al., 1995; Jensen et al., 2002). En este sentido, se resalta la importancia del ácido aspártico presente en la posición -1, el cual es de suma importancia para conferir una selectividad catiónica, como ocurre con las subunidades GRD (Hashim et al., 2022; Henry et al., 2020; Gisselmann et al., 2004).

Adicionalmente, los nuevos receptores descritos en este trabajo respondieron al GABA y al muscimol de una manera dependiente de la concentración. Respecto a las curvas concentración–respuesta, se evidenció que los receptores heteroméricos PcGABA_{A} tienen una mayor sensibilidad para el GABA que para el muscimol. Ambos tipos de receptores heteroméricos tienen un n_{H} muy similar, lo que sugiere que tanto para el GABA como para el muscimol hay una cooperatividad positiva en las cestas de unión para el neurotransmisor, y que es necesario que estén ocupados al menos dos cestas de unión para una activación completa del receptor. Considerando que los datos farmacológicos de los receptores heteroméricos $\text{PcGABA}_{\text{A}}\text{-}\beta 2 + \text{PcGABA}_{\text{A}}\text{-}\beta$ y $\text{PcGABA}_{\text{A}}\text{-}\alpha + \text{PcGABA}_{\text{A}}\text{-}\beta$ son similares, se sugiere que la subunidad $\text{PcGABA}_{\text{A}}\text{-}\beta$ podría ejercer un papel crucial en la sensibilidad de los receptores

heteroméricos formados ya que contribuye con una de las interfases necesarias para formar la cesta de unión para el agonista.

Uno de los resultados más interesantes es que las respuestas obtenidas con ambas combinaciones (PcGABA_A-β₂ + PcGABA_A-β y PcGABA_A-α + PcGABA_A-β), fueron sensibles a la picrotoxina. Esto es particularmente intrigante debido a que se ha descrito ampliamente a la PTX como un bloqueador del poro de receptores aniónicos del asa Cys. Sin embargo, en este trabajo se demostró que también inhibe la corriente catiónica registrada por los receptores PcGABA_A-α + PcGABA_A-β. Para poder entender dicho efecto, se ha demostrado que el sitio de unión para la PTX se encuentra en el poro del canal, a unos aminoácidos de distancia de la región del filtro de selectividad (Gurley et al., 1995; Hibbs & Gouaux, 2011; Shu et al., 2021). Sorprendentemente, todas las subunidades PcGABA_A presentan en esta región aminoácidos muy similares, lo cual permitiría entender por qué la sensibilidad para la PTX es compartida. Además, se evaluó la sensibilidad de receptores PcGABA_A para la bicuculina, y como se ha descrito para otros receptores del asa Cys de invertebrados, se demostró que este agonista tampoco tuvo el efecto inhibitorio descrito en receptores de vertebrados (Jiménez-Vázquez et al., 2016; Nicholl et al., 2017).

Respecto a la amplificación del ADN complementario, todas las subunidades clonadas a partir del tallo ocular de acocil son ampliamente expresadas en esta región, sugiriendo un papel muy importante en la neurotransmisión. Es interesante resaltar que el cúmulo de neuronas que forman las distintas médulas, así como el órgano-X regulan distintas funciones fisiológicas del organismo, tal como el metabolismo hidromineral, crecimiento, reproducción, etc. (García & Aréchiga, 1998; Garduño et al., 2002; Mykles & Chang, 2020; Purna & Nagaraju, 2011). Por lo tanto, reconocer el tipo de subunidades que son expresadas en estas regiones podría ayudar a predecir el tipo de receptores que se pueden formar, así como plantear un posible papel fisiológico, como se ha descrito en otros trabajos en tejido nervioso y muscular (Reddy & Reddy, 2012; Serrano et al., 2003). También se encontró que las subunidades PcGABA_A-β y PcGABA_A-β₂ son expresadas en tejido

nervioso y muscular, reafirmando que estas subunidades se pueden combinar para formar receptores heteroméricos funcionales de manera nativa, formando receptores aniónicos que podrían modular la transmisión inhibitoria, tal como se ha encontrado para las subunidades homólogas RDL y LCCH3 de insectos (Dupuis et al., 2010; Henry et al., 2020; Ménard et al., 2018). En contraste, la subunidad PcGABA_A- α parece ser expresada exclusivamente en tejido nervioso, formando parte de receptores heteroméricos restringido a neuronas. Aún más importante es que la subunidad PcGABA_A- α parece formar parte de receptores con selectividad catiónica, muy similar a lo reportado para la subunidad GRD de insectos (Beg and Jorgensen, 2003; Gisselmann et al., 2004; Hashim et al., 2022; Henry et al., 2020; Jobson et al., 2015). Sin embargo, aunque este trabajo ha demostrado evidencias que apoyan la idea de que las subunidades PcGABA_A se pueden combinar para formar receptores heteroméricos funcionales, la estequiometría y arreglo espacial de éstas todavía no es claro, ni cómo es que se forman de manera nativa. Cabe mencionar que las respuestas aniónicas y catiónicas han sido observadas en las neuronas del órgano-X y, por lo tanto, se puede concluir que las subunidades descritas en este trabajo son las responsables de dicho fenómeno. Sin embargo, el cómo estas subunidades participan en la neuromodulación de la transmisión GABAérgica por medio de excitación o inhibición todavía permanece poco clara.

Respecto a la fluorescencia por hibridación *in situ*, se determinó que las subunidades PcGABA_A son expresadas en las neuronas del órgano X, así como en los fotorreceptores. Se determinó que los ARNm de las subunidades PcGABA_A- β 2 y PcGABA_A- α están presentes en las regiones citoplasmáticas y perinucleares de las neuronas del órgano-X. En conjunto, todos estos resultados confirman que estas subunidades son expresadas en dichas neuronas y que se pueden combinar entre ellas para ensamblar receptores heteroméricos funcionales que reproducen la respuesta al GABA observada previamente (Jiménez-Vázquez et al., 2016).

Finalmente, para explicar el papel funcional del receptor catiónico descrito en este trabajo, se realizó la estrategia experimental descrita en la Figura 25a. Es importante destacar que la estructura del tallo ocular contiene al tejido nervioso dentro de una

cápsula que permite aislarlo del contenido hemolinfático circundante del pedúnculo ocular. Curiosamente el soma de las neuronas del órgano-X no está dentro de dicha cápsula, lo que permite que estas neuronas sean irrigadas por la hemolinfa del organismo. Además, se ha demostrado que el GABA puede modular la actividad de las neuronas del órgano X (Garduño et al., 2002), aunado al hecho de que la concentración del GABA en la hemolinfa cambian durante el día, fluctuando desde 0.16 μM medido a las 00:00 hrs, y alcanzando la concentración de 41 μM a las 18:00 hrs (datos no publicados). Por lo tanto, se puede sugerir que el GABA circulante en la hemolinfa podría modificar la actividad de las neuronas del órgano X en condiciones fisiológicas normales. Por lo tanto, el GABA puede llegar directamente al soma de estas neuronas por cambios en su concentración en la hemolinfa, promoviendo un cambio en su excitabilidad, como se observa en la Figura 25. Esto permite suponer que los cambios en la concentración del GABA en la hemolinfa modifican la actividad eléctrica de estas neuronas, lo cual tendría importancia en regular la liberación del contenido neuropeptídico, favoreciendo algunas funciones celulares y conductuales.

CONCLUSIONES

Este trabajo contribuye al repertorio y conocimiento de nuevos receptores activados por GABA, pertenecientes a la superfamilia del asa Cys del acocil *P. clarkii*. La alta similitud molecular de las subunidades PcGABA_A-β2 y PcGABA_A-α con otras subunidades de receptores activados por el GABA procedentes de insectos, sugiere que pudo haber un ancestro en común del cuál se diversificaron en las distintas especies animales. Además, la caracterización funcional de estas subunidades mostró que pueden formar receptores con propiedades electrofisiológicas y farmacológicas únicas. Estos hallazgos son muy importantes para investigación futura que permita la caracterización de un perfil electrofisiológico y farmacológico completo, proponiendo la concatenación de proteínas como una estrategia que permita entender la estequiometría y arreglo espacial exacto de las subunidades que forman a los receptores heteroméricos, o bien, experimentos de mutación puntual o intercambio de dominios que permitan entender las bases moleculares de la selectividad iónica en receptores formados por distintas subunidades.

BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, S. P. H.; Mathie, A. ; Peters, J. A. ; Veale, E. L. ; Striessnig, J. ; Kelly, E. ; Armstrong, J. F. ; Faccenda, E. ; Collaborators, CGTP., Harding, S. D. ; Pawson, A. J. ; Sharman, J. L. ; Southan, C. ; & Davies, J. A. : (2019). THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2019/20: Ion channels. *British Journal of Pharmacology*, 176(S1), S142–S228. <https://doi.org/10.1111/bph.14749>
- Ashby, J. A., McGonigle, I. V., Price, K. L., Cohen, N., Comitani, F., Dougherty, D. A., Molteni, C., & Lummis, S. C. R. (2012). GABA binding to an insect GABA receptor: A Molecular Dynamics and Mutagenesis Study. *Biophysical Journal*, 103(10), 2071–2081. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.10.016>
- Awapara, J., Landua, A., Fuerst, R., & Seale, B. (1950). Free gamma-aminobutyric acid in brain. *The Journal of Biological Chemistry*, 181(1), 35–39.
- Barnard, E. A., Skolnick, P., Olsen, R. W., Mohler, L., Sieghart, W., Biggio, G., Braestrup, C., Bateson, A. N., & Langer, S. Z. (2008). International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of γ -aminobutyric acidA receptors: Classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacological Reviews*, 60(3), 243–260. <https://doi.org/10.1124/pr.108.00505>
- Beg, A. A., & Jorgensen, E. M. (2003). EXP-1 is an excitatory GABA-gated cation channel. *Nature Neuroscience*, 6(11), 1145–1152. <https://doi.org/10.1038/nn1136>
- Benarroch, E. E. (2012). GABAB receptors: Structure, functions, and clinical implications. *Neurology*, 78(8), 578–584. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318247cd03>
- Bettler, B., Kaupmann, K., Mosbacher, J., & Gassmann, M. (2004). Molecular Structure and Physiological Functions of GABA B Receptors. *Physiological Reviews*, 84(3), 835–867. <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2003>
- Bocquet, N., Nury, H., Baaden, M., Le Poupon, C., Changeux, J. P., Delarue, M., & Corringer, P. J. (2009). X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation. *Nature*, 457(7225), 111–114. <https://doi.org/10.1038/nature07462>
- Boistel, J., & Fatt, P. (1958). Membrane permeability change during inhibitory transmitter action in crustacean muscle. *The Journal of Physiology*, 144, 176–191. <https://doi.org/10.1152/jn.1973.36.5.805>
- Bormann, J. (2000). The “ABC” of GABA receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 21(1), 16–19. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(99\)01413-3](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(99)01413-3)
- Bormann, J., & Feigenspan, A. (1995). GABAC receptors. *Trends in Neurosciences*, 18(12), 515–519. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(95\)98370-E](https://doi.org/10.1016/0166-2236(95)98370-E)
- Bowery, N. G. (1993). Gabab Receptor. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 33, 109–147.

- Brickley, S. G., & Mody, I. (2012). Extrasynaptic GABA A Receptors: Their Function in the CNS and Implications for Disease. *Neuron*, 73(1), 23–34.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.12.012>
- Chang, Y., Wang, R., Barot, S., & Weiss, D. S. (1996). Stoichiometry of a recombinant GABAA receptor. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(17), 5415–5424. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-17-05415.1996>
- Chen, R., Belelli, D., Lambert, J. J., Peters, J. A., Reyes, A., & Lan, N. C. (1994). Cloning and functional expression of a Drosophila γ -aminobutyric acid receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(13), 6069–6073.
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.13.6069>
- Chua, H. C., & Chebib, M. (2017). GABAA Receptors and the Diversity in their Structure and Pharmacology. In *Advances in Pharmacology* (1st ed., Vol. 79). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.03.003>
- Collingridge, G. L., Olsen, R. W., Peters, J., & Spedding, M. (2009). A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology*, 56(1), 2–5.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.06.063>
- Comitani, F., Limongelli, V., & Molteni, C. (2016). The free energy landscape of GABA binding to a pentameric ligand-gated ion channel and its disruption by mutations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 12(7), 3398–3406.
<https://doi.org/10.1021/acs.jctc.6b00303>
- Cutting, G. R., Lu, L., O'hara, B. F., Kascht, L. M., Montrose-Rafizadeh, C., Donovan, D. M., Shimada, S., Antonarakis, S. E., Guggino, W. B., Uhlii1, G. R., Kazazian, H. H., & Littlefield, J. W. (1991). Cloning of the γ -aminobutyric acid (GABA) P1 cDNA: A GABA receptor subunit highly expressed in the retina (ligand-gated ion-channel receptors/polymerase chain reaction/chloride channels/gene family/oocyte expression). In *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* (Vol. 88).
- Darlison, M. G., Pahal, I., & Thode, C. (2005). Consequences of the evolution of the GABAA receptor gene family. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25(3–4), 607–624.
<https://doi.org/10.1007/s10571-005-4004-4>
- Davis, M. W., & Jorgensen, E. M. (2022). ApE, A Plasmid Editor: A Freely Available DNA Manipulation and Visualization Program. *Frontiers in Bioinformatics*, 2(February), 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fbinf.2022.818619>
- Dupuis, J. P., Bazelot, M., Barbara, G. S., Paute, S., Gauthier, M., & Raymond-Delpech, V. (2010). Homomeric RDL and heteromeric RDL/LCCH3 GABA receptors in the honeybee antennal lobes: Two candidates for inhibitory transmission in olfactory processing. *Journal of Neurophysiology*, 103(1), 458–468. <https://doi.org/10.1152/jn.00798.2009>
- Edwards, C., & Ottosont, D. (1958). The site of impulse initiation in a nerve cell of a crustacean stretch receptor. *The Journal of Physiology*, 143, 138–148.

- Fisher, J. L., & Macdonald, R. L. (1997). Functional properties of recombinant GABA(A) receptors composed of single or multiple β subunit subtypes. *Neuropharmacology*, 36(11–12), 1601–1610. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(97\)00133-0](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(97)00133-0)
- Frommer, W. B., & Ninnemann, O. (1995). Heterologous expression of genes in bacterial, fungal, animal, and plant cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46, 419–444. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.46.060195.002223>
- Furshpan, B. Y. E. J., & Potter, D. D. (1959). *GIANT MOTOR FIBRE OF THE CRAYFISH fibres in the nerve cord of the crayfish (Furshpan & Potter , 1959). These were.* 326–335.
- García, U., & Aréchiga, H. (1998). Regulation of Crustacean Neurosecretory Cell Activity. In *Cellular and molecular neurobiology* (Vol. 18). <https://doi.org/10.1023/A:1022527210808>
- Garduño, J., Elenes, S., Cebada, J., Becerra, E., & García, U. (2002). Expression and functional characterization of GABA transporters in crayfish neurosecretory cells. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(21), 9176–9184.
- Gisselmann, G., Plonka, J., Pusch, H., & Hatt, H. (2004). Drosophila melanogaster GRD and LCCH3 subunits form heteromultimeric GABA-gated cation channels. *British Journal of Pharmacology*, 142(3), 409–413. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705818>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning. A laboratory manual* (4th Ed, Vol. 33, Issue 1). Cold Spring Harbor, N.Y.:Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Gupta, R., & Brunak, S. (2002). Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pacific Symposium on Biocomputing. Pacific Symposium on Biocomputing*, 322, 310–322. https://doi.org/10.1142/9789812799623_0029
- Gurley, D., Amin, J., Ross, P. C., Weiss, D. S., & White, G. (1995). Point mutations in the M2 region of the alpha, beta, or gamma subunit of the GABAA channel that abolish block by picrotoxin. *Receptors & Channels*, 3(1), 13–20.
- Hackam, A. S., Wang, T. L., Guggino, W. B., & Cutting, G. R. (1997). The N-terminal domain of human GABA receptor $\rho 1$ subunits contains signals for homooligomeric and heterooligomeric interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 272(21), 13750–13757. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.21.13750>
- Hashim, O., Charvet, C. L., Toubaté, B., Ahmed, A. A. E., Lamassiaude, N., Neveu, C., Dimier-Poisson, I., Debierre-Grockiego, F., & Dupuy, C. (2022). Molecular and Functional Characterization of GABA Receptor Subunits GRD and LCCH3 from Human Louse *Pediculus Humanus Humanus*. *Molecular Pharmacology*, 102(2), 116–127. <https://doi.org/10.1124/molpharm.122.000499>
- Henderson, J. E., Soderlund, D. M., & Knipple, D. C. (1993). Characterization of a putative γ -aminobutyric acid (GABA) receptor β subunit gene from *Drosophila melanogaster*. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 193, Issue 2, pp. 474–482). <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1648>

- Henry, C., Cens, T., Charnet, P., Cohen-Solal, C., Collet, C., van-Dijk, J., Guiramand, J., de Jésus-Ferreira, M. céleste, Menard, C., Mokrane, N., Roussel, J., Thibault, J. B., Vignes, M., & Rousset, M. (2020). Heterogeneous expression of GABA receptor-like subunits LCCH3 and GRD reveals functional diversity of GABA receptors in the honeybee *Apis mellifera*. *British Journal of Pharmacology*, *177*(17), 3924–3940. <https://doi.org/10.1111/bph.15135>
- Hibbs, R. E., & Gouaux, E. (2011). Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. *Nature*, *474*(7349), 54–60. <https://doi.org/10.1038/nature10139>
- Hilf, R. J. C., & Dutzler, R. (2009). Structure of a potentially open state of a proton-activated pentameric ligand-gated ion channel. *Nature*, *457*(7225), 115–118. <https://doi.org/10.1038/nature07461>
- Jensen, M. L., Timmermann, D. B., Johansen, T. H., Schousboe, A., Varming, T., & Ahring, P. K. (2002). The $\alpha 2$ subunit determines the ion selectivity of the GABA A receptor. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(44), 41438–41447. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205645200>
- Jiang, H., Qian, Z., Lu, W., Ding, H., Yu, H., Wang, H., & Li, J. (2015). Identification and characterization of reference genes for normalizing expression data from red swamp crawfish *Procambarus clarkii*. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(9), 21591–21605. <https://doi.org/10.3390/ijms160921591>
- Jiménez-Vázquez, E. N., Díaz-Velásquez, C. E., Uribe, R. M., Arias, J. M., & García, U. (2016). Molecular cloning and expression of a GABA receptor subunit from the crayfish *Procambarus clarkii*. *Journal of Neuroscience Research*, *94*(2), 190–203. <https://doi.org/10.1002/jnr.23695>
- Jobson, M. a., Valdez, C. M., Gardner, J., Garcia, L. R., Jorgensen, E. M., & Beg, a. a. (2015). Spillover Transmission Is Mediated by the Excitatory GABA Receptor LGC-35 in *C. elegans*. *Journal of Neuroscience*, *35*(6), 2803–2816. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4557-14.2015>
- Jones, D. T., Taylor, W. R., & Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices. *Bioinformatics*, *8*(3), 275–282.
- Kasaragod, V. B., Mortensen, M., Hardwick, S. W., Wahid, A. A., Dorovykh, V., Chirgadze, D. Y., Smart, T. G., & Miller, P. S. (2022). Mechanisms of inhibition and activation of extrasynaptic $\alpha\beta$ GABAA receptors. *Nature*, *602*(7897), 529–533. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04402-z>
- Keramidas, A., Moorhouse, A. J., Schofield, P. R., & Barry, P. H. (2004). Ligand-gated ion channels: Mechanisms underlying ion selectivity. In *Progress in Biophysics and Molecular Biology* (Vol. 86, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2003.09.002>
- Kleppner, S. R., & Tobin, A. J. (2002). GABA. *Encyclopedia of the Human Brain*, 353–367. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227210-2/00150-3>

- Knipple, D. C., & Soderlund, D. M. (2010). The ligand-gated chloride channel gene family of *Drosophila melanogaster*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97(2), 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.09.002>
- Kuffler, S. W. (1954). *Mechanisms of activation and motor control of stretch receptors in lobster and crayfish*. www.physiology.org/journal/jn
- Kuffler, S. W., & Edwards, C. (1958). Mechanism of gamma aminobutyric acid (GABA) action and its relation to synaptic inhibition. *Journal of Neurophysiology*, 21(6), 589–610.
- Le Novère, N., & Changeux, J. P. (1995). Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: An example of multigene family in excitable cells. *Journal of Molecular Evolution*, 40(2), 155–172. <https://doi.org/10.1007/BF00167110>
- Lester, H. A. (1992). *The permeation pathway of neurotransmitter-gated ion channels*. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1992;21:267-92. doi: 10.1146/annurev.bb.21.060192.001411
- Lester, H. A. ;, Mohammed, I. D. ;, Dahan, D. S. ;, Leite, J. F. ;, & Dougherty, D. A. (2004). *Cys-loop receptors: new twists and turns*. 27(6). <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.04.002>
- Lummis, S. C. R. (2009). Locating GABA in GABA receptor binding sites. *Biochemical Society Transactions*, 37(6), 1343–1346. <https://doi.org/10.1042/BST0371343>
- Macdonald, R. L., & Botzolakis, E. J. (2010). GABAA receptor channels. *Physiology and Pathology of Chloride Transporters and Channels in the Nervous System, Chapter 7*, 257–282. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374373-2.00014-5>
- Manfrin, C., Tom, M., De Moro, G., Gerdol, M., Giulianini, P. G., & Pallavicini, A. (2015). The eyestalk transcriptome of red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Gene*, 557(1), 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.12.001>
- Martenson, J. S., Yamasaki, T., Chaudhury, N. H., Albrecht, D., & Tomita, S. (2017). Assembly rules for GABAA receptor complexes in the brain. *ELife*, 6, 1–18. <https://doi.org/10.7554/elife.27443>
- Ménard, C., Folacci, M., Brunello, L., Charreton, M., Collet, C., Mary, R., Rousset, M., Thibaud, J. B., Vignes, M., Charnet, P., & Cens, T. (2018). Multiple combinations of RDL subunits diversify the repertoire of GABA receptors in the honey bee parasite *Varroa destructor*. *Journal of Biological Chemistry*, 293(49), 19012–19024. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005365>
- Millar, N. S., Buckingham, S. D., & Sattelle, D. B. (1994). Stable expression of a functional homo-oligomeric *Drosophila* GABA receptor in a *Drosophila* cell line. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 258(1353), 307–314. <https://doi.org/10.1098/rspb.1994.0178>
- Möller, S., Croning, M. D. R., & Apweiler, R. (2001). Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics*, 17(7), 646–653. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.7.646>

- Mykles, D. L., & Chang, E. S. (2020). General and Comparative Endocrinology Hormonal control of the crustacean molting gland : Insights from transcriptomics and proteomics. *General and Comparative Endocrinology*, 294(April), 113493. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113493>
- Naffaa, M. M., Hung, S., Chebib, M., Johnston, G. A. R., & Hanrahan, J. R. (2017). GABA- ρ receptors: distinctive functions and molecular pharmacology. In *British Journal of Pharmacology* (Vol. 174, Issue 13, pp. 1881–1894). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/bph.13768>
- Nicholl, G. C. B., Jawad, A. K., Weymouth, R., Zhang, H., & Beg, A. A. (2017). Pharmacological characterization of the excitatory ‘Cys-loop’ GABA receptor family in *Caenorhabditis elegans*. *British Journal of Pharmacology*, 174(9), 781–795. <https://doi.org/10.1111/bph.13736>
- Olsen, R. W., & Sieghart, W. (2008). International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of - Aminobutyric AcidA Receptors: Classification on the Basis of Subunit Composition, Pharmacology, and Function. Update. *Pharmacological Reviews*, 60(3), 243–260. <https://doi.org/10.1124/pr.108.00505>
- Olsen, W., & Tobin, J. (1990). Molecular biology of GABAA receptors. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 4(5), 1469–1480.
- Ortells, M. O., & Lunt, G. G. (1995). Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends in Neurosciences*, 18(3), 121–127. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(95\)93887-4](https://doi.org/10.1016/0166-2236(95)93887-4)
- Pearson, W. R. (2013). An Introduction to Sequence Similarity (“Homology”) Searching. *Current Protocols Bioinformatics*, 1(10), 1286–1292. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0301s42>
- Purna, G., & Nagaraju, C. (2011). *Reproductive regulators in decapod crustaceans : an overview*. 3–16. <https://doi.org/10.1242/jeb.047183>
- Ranganathan, R., Cannon, S. C. ;, & Horvitz, H. R. (2000). MOD-1 is a serotonin-gated chloride channel that modulates locomotory behaviour in *C. elegans*. *Letters to Nature*, 408, 470–475.
- Rao, R. ;, Shah, S. ;, Bhattacharya, D. ;, Toukam, D. K. ;, Cáceres, R. ;, Pomeranz Krummel, D. A. ;, & Sengupta, S. ; (2022). Ligand-Gated Ion Channels as Targets for Treatment and Management of Cancers. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.839437>
- Reddy, R., & Reddy, S. (2012). Eyestalk hormones on molting and reproduction concepts of Neuropeptide hormones in crab. *AV Akademikerverlag GmbH & Co. KG, January*.
- Roberts, E., & Frankel, S. (1950). Gamma-aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 187(1), 55–63.

- Sánchez-Jaramillo, E., Wittmann, G., Menyhért, J., Singru, P., Gómez-González, G. B., Sánchez-Islas, E., Yáñez-Recendis, N., Pimentel-Cabrera, J. A., León-Olea, M., Gereben, B., Fekete, C., Charli, J. L., & Lechan, R. M. (2022). Origin of thyrotropin-releasing hormone neurons that innervate the tuberomammillary nuclei. *Brain Structure and Function*, 227(7), 2329–2347. <https://doi.org/10.1007/s00429-022-02527-5>
- Serrano, L., Blanvillain, G., Soye, D., Charmantier, G., Grousset, E., Aujoulat, F., & Spanings-Pierrot, C. (2003). Putative involvement of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the neuroendocrine mediation of osmoregulation in the crayfish *Astacus leptodactylus*. *Journal of Experimental Biology*, 206(6), 979–988. <https://doi.org/10.1242/jeb.00178>
- Shu, H. J., Lu, X., Bracamontes, J., Steinbach, J. H., Zorumski, C. F., & Mennerick, S. (2021). Pharmacological and Biophysical Characteristics of Picrotoxin-Resistant, δ Subunit-Containing GABAA Receptors. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 13(November), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2021.763411>
- Sigel, E., & Steinmann, M. E. (2012). Structure, function, and modulation of GABAA receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 287(48), 40224–40231. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.386664>
- Smart, T. G., & Stephenson, F. A. (2019). A half century of γ -aminobutyric acid. *Brain and Neuroscience Advances*, 3, 239821281985824. <https://doi.org/10.1177/2398212819858249>
- Takeuchi, A., & Takeuchi, N. (1965). Localized action of gamma-aminobutyric acid on the crayfish muscle. *The Journal of Physiology*, 177, 225–238.
- Takeuchi, A., & Takeuchi, N. (1966). A study of the inhibitory action of gamma-aminobutyric acid on neuromuscular transmission in the crayfish. *The Journal of Physiology*, 183, 418–432.
- Oson, A. J., Lester, H. A., & Lummis, S. C. R. (2010). The structural basis of function in Cys-loop receptors. In *Quarterly Reviews of Biophysics* (Vol. 43, Issue 4). <https://doi.org/10.1017/S0033583510000168>
- Tom, M., Manfrin, C., Chung, S. J., Sagi, A., Gerdol, M., De Moro, G., Pallavicini, A., & Giulianini, P. G. (2014). Expression of cytoskeletal and molt-related genes is temporally scheduled in the hypodermis of the crayfish *Procambarus clarkii* during premolt. *Journal of Experimental Biology*, 217(23), 4193–4202. <https://doi.org/10.1242/jeb.109009>
- Van Der Kloot, W. G., Robbins, J. A. Y., & Cooke, I. A. N. M. (1958). Blocking by Picrotoxin of Peripheral Inhibition in Crayfish. *Science*, 127(3297), 521–522.
- Xu, C., Zhang, W., Rondard, P., Pin, J. P., & Liu, J. (2014). Complex GABA Receptor complexes: How to generate multiple functionally distinct units from a single receptor. *Frontiers in Pharmacology*, 5 FEB(February), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00012>