



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

“Identificación de RNAm de canales de K⁺ y
Ca²⁺ expresados en células RCE1 de epitelio
corneal”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO

P R E S E N T A :

JAMES ENRIQUE GONZÁLEZ FLORES

Directora de tesis: Dra. Ma. del Refugio García Villegas

México, DF., Abril de 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

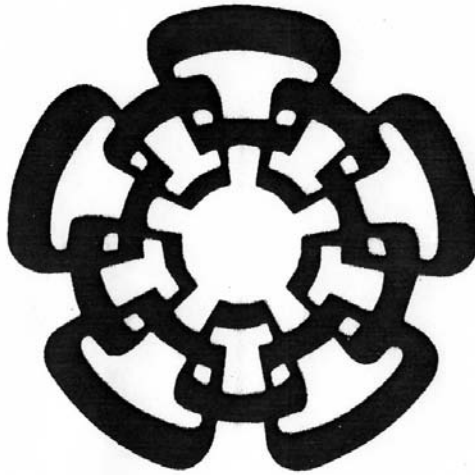
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“Identificación de RNAm de canales de K^+ y Ca^{2+} expresados en células RCE1 de epitelio corneal”

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN en el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, México DF.



Bajo la dirección de la

Dra. Ma. del Refugio García Villegas

y las revisiones de

Dra. Bertha Segura Alegría

Dr. Diego Julio Arenas Aranda

Dr. Elías Piedra Ibarra

M. en C. Ma. de Jesús Laura Castañeda Partida

ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	1
Lista de figuras.....	3
Lista de tablas.....	5
1. Introducción.....	6
1.1. Canales iónicos.....	6
1.1.1. Canales de K ⁺ dependientes de voltaje.....	6
1.1.1.1. Clasificación y estructura.....	7
1.1.1.2. Biología molecular y diversidad.....	9
1.1.1.3. Canales de K ⁺ de la familia K _v 1.....	12
1.1.2. Canales de potasio dependientes de calcio (K _{Ca}).....	12
1.1.2.1. Clasificación y estructura.....	12
1.1.2.2. Biología molecular y diversidad.....	13
1.1.2.3. Canal de potasio dependiente de calcio Maxi-K.....	13
1.1.3. Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje Ca _v	15
1.1.3.1. Clasificación y estructura.....	16
1.1.3.2. Biología molecular y diversidad.....	17
1.1.3.3. Canales de Ca ²⁺ de la familia Ca _v 1.....	18
1.1.4. Farmacología de los canales iónicos.....	18
1.1.4.1. Bloqueadores de canales de la familia K _v 1.....	18
1.1.4.2. Bloqueadores del canal Maxi-K.....	19
1.1.4.3. Bloqueadores de canales de la familia Ca _v 1.....	19
1.2. Canales de K ⁺ y de Ca ²⁺ en el fenómeno de la proliferación celular.....	20
1.2.1. Canales de K ⁺ en la proliferación celular.....	20
1.2.1.1. Canales de la familia K _v 1 y K _{Ca} en la proliferación celular...	21
1.2.2. Canales de calcio de la familia Ca _v 1 en la proliferación.....	23
1.3. Identificación molecular de canales de K ⁺ expresados en la línea celular MDCK.....	24

1.4. Epitelio corneal.....	27
1.4.1. Identificación de canales de K ⁺ en el epitelio corneal.....	27
1.4.2. El epitelio corneal como modelo de la proliferación celular.....	28
1.4.3. Células RCE1.....	29
2. Justificación.....	33
3. Objetivo general.....	34
4. Objetivos particulares.....	35
5. Metodología.....	36
5.1. Aislamiento de células de epitelio corneal (ECC).....	36
5.2. Cultivo celular de células RCE1.....	37
5.3. Aislamiento de RNA total.....	38
5.4. Retrotranscripción acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	39
5.4.1. Amplificación por PCR de RNAm de canales de potasio de la familia K _v 1.....	40
5.5. Diseño de oligonucleótidos específicos de la familia K _v 1.....	41
5.6. Amplificación por PCR del RNAm de los canales de K ⁺ y Ca ²⁺	41
5.6.1. Canales K _v 1.1, K _v 1.4 y K _v 1.6.....	41
5.6.2. Canal de potasio Maxi-K.....	42
5.6.3. Canales de calcio de la familia Ca _v 1.....	43
5.7. Clonación, secuenciación e identificación de los fragmentos amplificados por PCR.....	43
5.7.1. Clonación de fragmentos K _v 1 y Maxi-K.....	43
5.7.1.1. Aislamiento de DNA de plásmido por Miniprep.....	46
5.7.1.2. Análisis de clonas por restricción con la enzima Eco RI...	47
5.7.1.3 Electroforesis de fragmentos obtenidos por PCR.....	47
5.7.2. Secuenciación de los fragmentos de PCR clonados en el plásmido.....	47
5.7.3. Identificación <i>in silico</i> de los canales K _v 1 secuenciados.....	48

5.8. Cinética de crecimiento de las células RCE1 en presencia del bloqueador de canales de K ⁺ TEA.....	48
6. Resultados.....	50
6.1. Identificación de canales de potasio de la familia K _v 1 en el epitelio corneal.....	50
6.1.1. Amplificación de canales de potasio de la familia K _v 1.....	50
6.1.2. Selección de clonas K _v 1.....	52
6.1.3. Identificación <i>in silico</i> de las secuencias clonadas de los canales K _v 1.....	54
6.1.4. Alineamiento de los canales K _v 1 identificados.....	64
6.1.5. Expresión de canales K _v 1 en células RCE1 y en epitelio corneal.....	65
6.2. Identificación del canal de potasio Maxi-K en epitelio corneal.....	69
6.2.1. Amplificación del RNAm del canal de potasio Maxi-K.....	69
6.2.3. Identificación <i>in silico</i> de la secuencia 4 (Maxi-K).....	73
6.2.4. Alineamiento de MaxiK-RCE1.....	74
6.3. Identificación de los canales de calcio de la familia Ca _v 1 en epitelio corneal.....	76
6.4. Efecto del TEA sobre el crecimiento de las células RCE1.....	78
7. Discusión.....	79
8. Conclusiones.....	88
9. Referencias.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS

Ap: Ampicilina

4-AP: 4-aminopiridina

BK ó Maxi-K: Canal de potasio activado por Ca^{2+} de alta conductancia

Ca_v : Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje

CAV1F: Oligonucleótido sentido Ca_v1

CAV1R: Oligonucleótidos antisentido Ca_v1

Chtx: Caribdotoxina

DHP: dihidropiridinas

cDNA: Ácido Desoxirribonucleico complementario

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

dNTP's: Desoxirribonucleótidos

DsloF: Oligonucleótidos sentido Maxi-K

DsloR: Oligonucleótidos antisentido Maxi-K

α DTx: α Dentrotoxina

eag: Canal de K^+ dependiente de voltaje ether a-go-go

EtBr: Bromuro de etidio

ECC: Epitelio Corneal de Conejo

EDTA: Ácido Tetracético EtilenDiamina

FSB: Suero Fetal Bovino

IPTG: Isopropylthiogalactosido

K3: Queratina 3

K6: Queratina 6

K12: Queratina 12

K_{Ca} : Canales de K^+ activados por Ca^{2+}

K_v : Canales de K^+ dependientes de voltaje

KCNQ: Canales de K^+ dependientes de voltaje rectificadores tardios lentos

KV1F: Oligonucleótido sentido K_v1

KV1R: Oligonucleótido antisentido K_v1

$K_v1.1$: Canal de K^+ dependiente de voltaje de la familia *Shaker*, miembro 1

$K_v1.4$: Canal de K^+ dependiente de voltaje de la familia *Shaker*, miembro 4

$K_v1.6$: Canal de K^+ dependiente de voltaje de la familia *Shaker*, miembro 6

LB: Luria Bertani

LDH-H: Lactato Deshidrogenasas H

LDH-M: Lactato Deshidrogenasas M

MDCK: Línea células de riñón de perro

MgTx: Margatoxina

MK ó IK: Canales de potasio activados por Ca^{2+} de mediana conductancia

OLGs: Oligodendrocitos

OP: Oligodendrocitos Progenitores

PBS: Buffer de fosfatos

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

RCE1: Línea celular de epitelio corneal de conejo

RNA: Acido Ribonucleico

RNAi: Acido Ribonucleico de interferencia

RNAm: Acido Ribonucleico mensajero

RT-PCR: Retrotranscripción acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa

SK: Canales de potasio activados por Ca^{2+} de baja conductancia

TAE: Tris-Acetato-EDTA

TE: Buffer Tris-EDTA

X-gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactosido

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Linajes de canales de K^+ .
- Figura 2.** Subunidad α de los canales K_V *Shaker*.
- Figura 3.** Diversidad de la superfamilia de canales iónicos dependientes de voltaje.
- Figura 4.** Los canales de potasio K_V están formados por cuatro subunidades α .
- Figura 5.** Esquema de la subunidad α y β del canal Maxi-K.
- Figura 6.** Esquema de las cinco subunidades de canales de Ca^{2+} .
- Figura 7.** Esquema que ilustra la probable función de algunos de los canales de la familia K_V1 en OP en la proliferación y diferenciación celular.
- Figura 8.** Expresión de RNA mensajeros de cuatro diferentes canales de K^+ en las células MDCK.
- Figura 9.** Expresión de los RNA mensajeros de los canales de K^+ .
- Figura 10.** Morfología del epitelio corneal.
- Figura 11.** Inducción del RNAm de la LDH-M y LDH-H durante la diferenciación del epitelio corneal.
- Figura 12.** Análisis de inmunoblot de las queratinas K3 y K12 de RCE1.
- Figura 13.** Expresión de RNAm de marcadores de diferenciación a diferentes días de cultivo en RCE1.
- Figura 14.** Disección y aislamiento del epitelio corneal de conejo.
- Figura 15.** Esquema resumen de la síntesis de cDNA de ECC y células RCE1 de 3 y 8 días de cultivo.
- Figura 16.** Mapa del vector de clonación pGEM-T Easy.
- Figura 17.** Selección de colonias en medio de ampicilina y colonias blancas y azules.
- Figura 18.** Cultivo de células RCE1.
- Figura 19.** Expresión de canales de K^+ de la familia K_V1 en células RCE1.
- Figura 20.** Selección de clonas K_V1 con insertos de ~200 pb.
- Figura 21.** Alineamiento de las secuencias 1, 2 y 3 contra las secuencias que resultaron tener el mayor porcentaje de identidad en el Gen Bank.

- Figura 22.** Secuencia 1 expresada en las células RCE1, registrada por el secuenciador ABIPRISM Modelo 3100.
- Figura 23.** Secuencia 2 expresada en las células RCE1, registrada por el secuenciador ABIPRISM Modelo 3100.
- Figura 24.** Secuencia 3 expresada en las células RCE1, registrada por el secuenciador ABIPRISM Modelo 3100.
- Figura 25.** Alineamiento de canales secuenciados $K_v1.1$, -1.4 y -1.6 amplificados con los oligonucleótidos KV1F y KV1R.
- Figura 26.** Expresión de los canales $K_v1.1$, -1.4 y -1.6 en RCE1 de 8 días y ECC.
- Figura 27.** Análisis de los sitios de restricción de los canales $K_v1.1$, -1.4 y -1.6, y las enzimas que los cortan.
- Figura 28.** Amplificación específica y análisis de restricción de los canales $K_v1.1$, -1.4 y -1.6.
- Figura 29.** Expresión del canal Maxi-K en células RCE1.
- Figura 30.** Selección de clonas Maxi-K con insertos de ~250 pb.
- Figura 31.** Secuencia 4 expresada en las células RCE1, registrada por el secuenciador ABIPRISM Modelo 3100.
- Figura 32.** Alineamiento de MaxiK-RCE1 VS MaxiK-GenBank de conejo.
- Figura 33.** Análisis de los sitios de restricción del canal MaxiK-RCE1 y las enzimas que lo cortan.
- Figura 34.** Amplificación y análisis de restricción del canal MaxiK-RCE1.
- Figura 35.** Expresión de canales iónicos de la familia Ca_v1 en células RCE1 y ECC con oligonucleótidos CAV1F-CAV1R.
- Figura 36.** Cinética de crecimiento de células RCE1 en presencia del bloqueador de canales de K^+ TEA.

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Condiciones de amplificación del RNAm de los canales $K_v1.1$, -1.4, -1.6, Maxi-K y Ca_v1 por PCR.
- Tabla 2.** Identificación *in silico* de la secuencia 1 (Programa BLAST blast-nucleótidos).
- Tabla 3.** Identificación *in silico* de la secuencia 2 (Programa BLAST blast-nucleótidos).
- Tabla 4.** Identificación *in silico* de la secuencia 3 (Programa BLAST blast-nucleótidos).
- Tabla 5.** Identificación *in silico* de la secuencia 1 (Programa BLAST blastx-proteínas).
- Tabla 6.** Identificación *in silico* de la secuencia 2 (Programa BLAST blastx-proteínas).
- Tabla 7.** Identificación *in silico* de la secuencia 3 (Programa BLAST blastx-proteínas).
- Tabla 8.** Identificación *in silico* de la secuencia 4 (Programa BLAST blastx-proteínas).

1. Introducción

1.1. Canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas de membrana que permiten el paso de iones a través de la membrana plasmática de forma selectiva y a favor del gradiente electroquímico. También son los responsables, entre otras funciones, del mantenimiento del potencial de membrana, de la contracción muscular, de la proliferación celular, permiten la regulación del volumen celular, participan en diversas vías de señalización y son los encargados de la generación y propagación del impulso nervioso.

En la actualidad se conoce una gran cantidad de información acerca de los canales iónicos, gracias a los numerosos trabajos realizados en el siglo XX. Sin embargo, se pueden mencionar de manera general algunas investigaciones que han revolucionado el conocimiento en este campo:

El primer autor en realizar trabajos en el campo de la biofísica de las membranas biológicas fue: Julius Bernstein al proponer que las células estaban rodeadas de una membrana aislante con una pequeña permeabilidad al potasio (Bernstein, 1912). Más tarde en el campo de la electrofisiología Alan Hodgkin y Andrew Huxley demostraron la participación del sodio en la excitabilidad celular (Hodgkin y Huxley, 1939).

Por otro lado, en el campo de la biología molecular de estas proteínas, la clonación y caracterización molecular de los canales iónicos, ayudó a identificar, clasificar y comprender su funcionamiento (Papazian *et al.*, 1987).

1.1.1. Canales de K⁺ dependientes de voltaje

Los canales iónicos tienen fundamentalmente dos componentes que los caracterizan: la permeabilidad y el mecanismo de apertura y cierre (Armstrong y Hille, 1998). Según estos dos componentes, los canales de potasio dependientes de voltaje (K_v) son aquellos que controlan el flujo de iones potasio a través de la membrana, y su

mecanismo de acción se basa en la sensibilidad a la diferencia de potencial a ambos lados de ésta.

En células excitables como las neuronas, estos canales determinan el potencial de reposo, la duración del potencial de acción, modulan la liberación de neurotransmisores y regulan la frecuencia de disparo (Trimmer, 1993). En el potencial de acción cardíaco distintos tipos de canales de potasio participan en cada una de las fases. Por lo tanto, los canales K_v generan la corriente transitoria de salida y la corriente rectificadora retardada de activación lenta que completa la repolarización del potencial de acción (Deal *et al.*, 1996).

En células no excitables las funciones de estos canales todavía no son bien conocidas, además del mantenimiento del potencial de membrana, se ha demostrado la participación de estos canales en distintas vías de señalización implicadas en procesos de control del volumen celular, proliferación, activación y apoptosis, por lo que su estudio ha sido de gran importancia (Deutsch y Chen, 1993; Wonderlin y Strobl, 1996; Cahalan y Chandy, 1997; Szabò *et al.*, 2004).

1.1.1.1. Clasificación y estructura

Los canales de potasio se encuentran de manera general en todas las células. Pertenecen a la familia estructural que posee seis segmentos transmembranales y se pueden subdividir en seis familias de genes conservados (Figura 1). Estas familias las forman; los canales K_v , KCNQ, *eag* y tres clases de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} (BK, MK y SK).

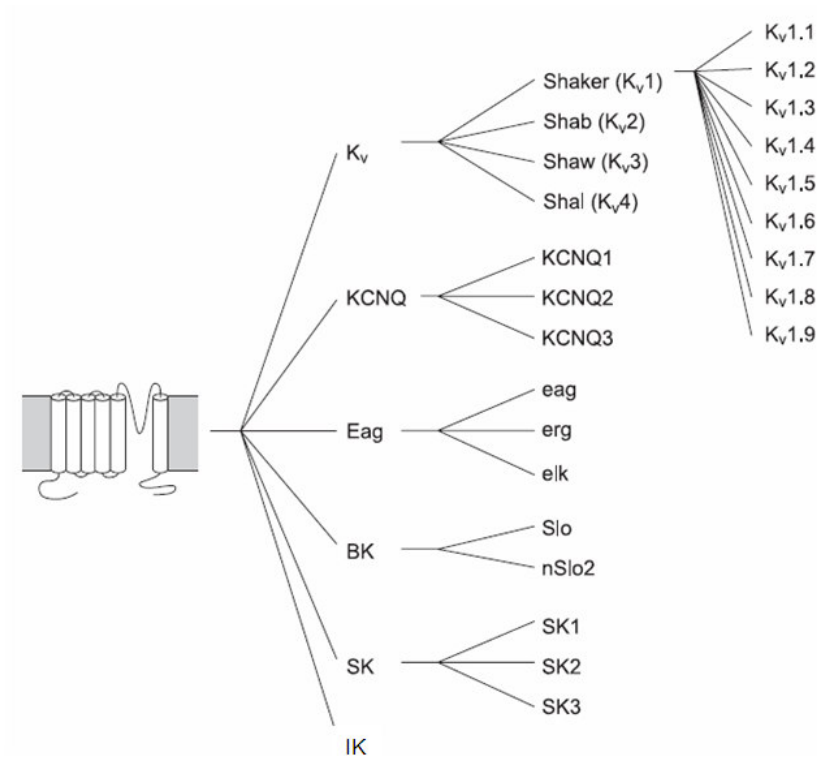


Figura 1. Linajes de canales de K^+ . Esquema de clasificación de los diferentes genes de canales de K^+ con seis segmentos transmembranales.

El grupo de los canales de K^+ están compuestos principalmente por canales de potasio dependientes de voltaje de la familia K_v . Estos canales están formados por cuatro subunidades α , cada una de las cuales contienen seis segmentos transmembranales (S1-S6) en forma de hélices, quedando los extremos amino y carboxilo intracelulares. La región conservada que conforma el poro y el filtro de selectividad está delimitada por los segmentos S5 y S6 unidos por un asa, denominada H5 que entra y sale de la membrana (Figura 2). El segmento transmembranal S4 está cargado positivamente. Esta estructura es sensible a cambios en el campo eléctrico, y su movimiento ante cambios de potencial en la membrana, es la base de la sensibilidad al voltaje de estos canales (Figura 2).

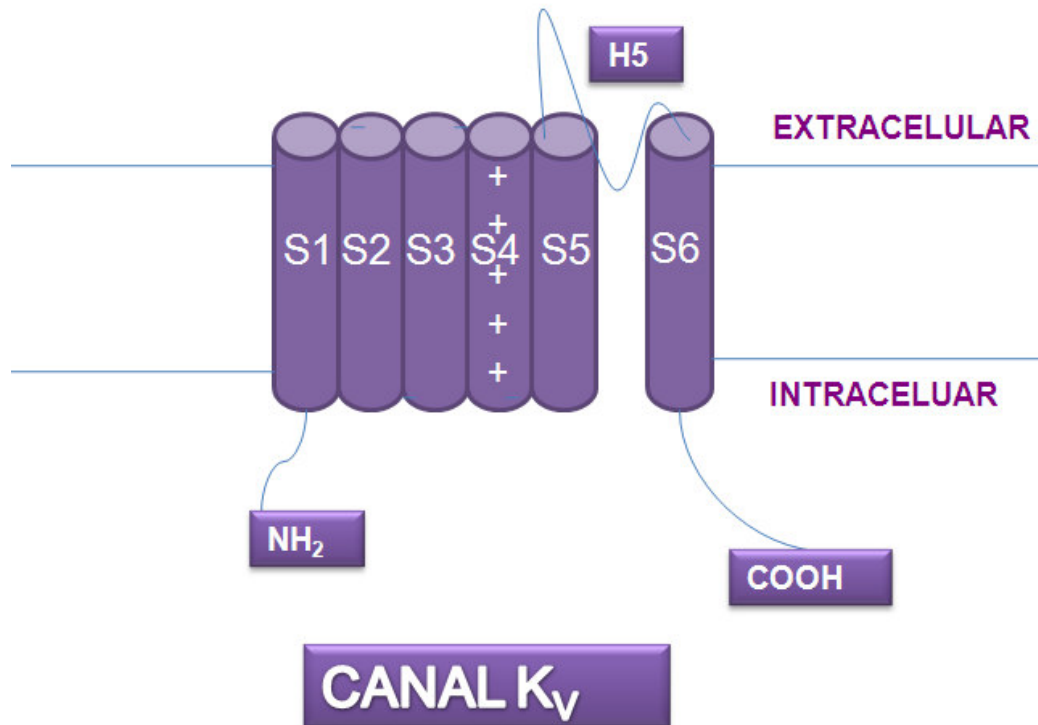


Figura 2. Subunidad α de los canales K_v . La subunidad α está formada por seis segmentos transmembranales. Entre el segmento S5 y S6 se encuentra el asa H5 que da selectividad al poro. El segmento S4 está cargado positivamente y es el sensor de voltaje.

1.1.1.2. Biología molecular y diversidad

El primer canal de potasio se clonó, a partir del mutante *Shaker* de la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster* (Papazian *et al.*, 1987). A partir de entonces comenzó la identificación de lo que es la familia de canales iónicos más diversa, los canales K_v . Inicialmente se clonaron cuatro genes de K_v en *Drosophila*: *Shaker*, *Shab*, *Shal* y *Shaw*. Dichos genes a su vez presentaban distintas isoformas por procesamiento diferencial de su RNAm. Los primeros canales que se clonaron en mamíferos se relacionaron con estas isoformas, de ahí que la subfamilia K_v1 se siga llamando *Shaker* y menos frecuentemente la K_v2 *Shab*, K_v3 *Shal* y K_v4 *Shaw* (Figura 3). En humanos, la mayoría de las isoformas descritas están codificadas por genes diferentes permitiendo una expresión diferencial en

los diferentes tipos celulares. Actualmente en humanos se conocen 11 subfamilias de canales K_v con 38 miembros en total.

La diferente nomenclatura que se adoptó por distintos laboratorios para nombrar a los diferentes clones conforme se iban identificando produjo gran confusión. Debido a esto se propuso una nomenclatura sistemática que actualmente es muy recurrida (Chandy *et al.*, 1991; Chandy y Gutman, 1993; Gutman *et al.*, 2003). Este sistema nombra a los canales según la estructura: $K_{vx.y}$ Donde la “K” se refiere a canal de potasio, la “v” a su dependencia del voltaje, “x” es el número que haría referencia a la familia génica, e “y” numera los canales de cada subfamilia en el orden conforme se han clonado.

Además de la gran cantidad de canales K_v existentes, esta diversidad se ve incrementada en el proceso de tetramerización. Como ya se ha comentado estos canales los conforman 4 subunidades α (Figura 4), sin embargo los complejos que generan pueden ser homo o heterotetraméricos (Christie *et al.*, 1990; Isacoff *et al.*, 1990; Ruppersberg *et al.*, 1990).

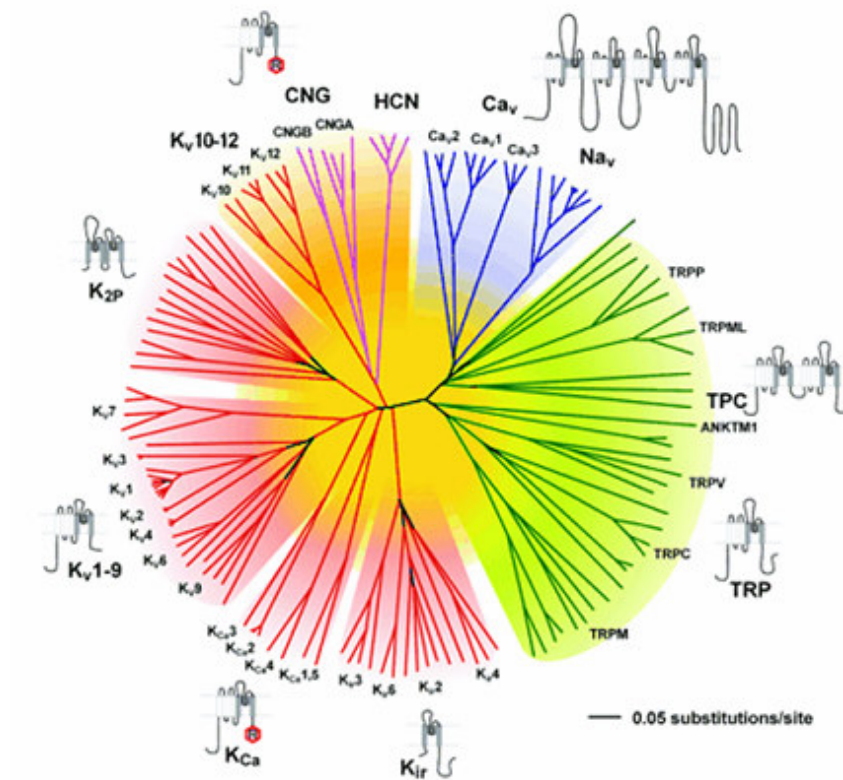


Figura 3. Diversidad de la superfamilia de canales iónicos dependientes de voltaje. El estudio fue realizado mediante la relación de aminoácidos de las regiones mínimas del poro. Tomado de: Yu *et al.*, 2005.

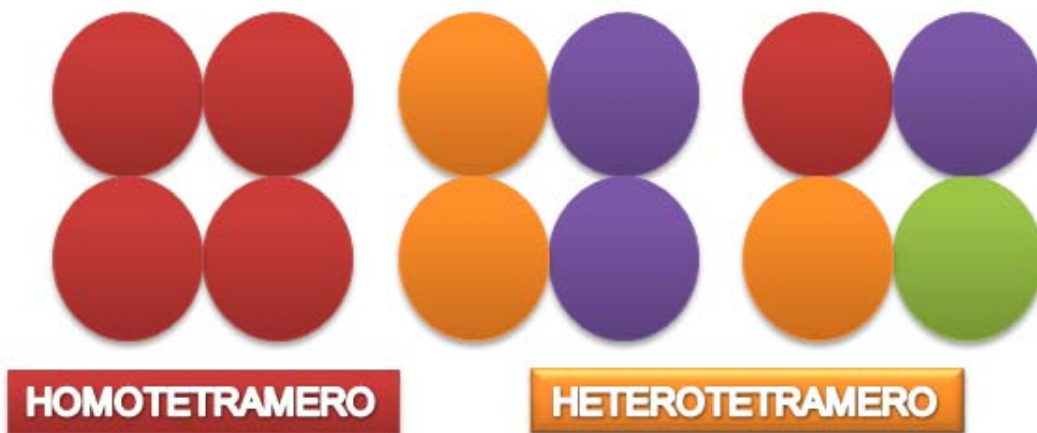


Figura 4. Los canales de potasio K_V están formados por cuatro subunidades α . Los canales de potasio K_V pueden ser homo o heterotetrameros. Cada círculo representa una subunidad α , los canales formados de subunidades iguales se llaman homotetrameros, mientras los que están conformados por subunidades de diferentes canales se les denomina heterotetrameros. Ambas combinaciones son funcionales *in vivo*.

1.1.2. Canales de potasio dependientes de calcio (K_{Ca})

Es un grupo de canales de K^+ estructuralmente diverso y la propiedad en común que tienen es la activación por un incremento de Ca^{2+} intracelular. Se encuentran en casi todas las células nerviosas en donde juegan un papel importante controlando el potencial de acción y regulando la excitabilidad celular.

1.1.2.1. Clasificación y estructura

Los canales de potasio dependientes de calcio se pueden clasificar en tres tipos; BK, MK y SK, los cuales pueden ser distinguidos electrofisiológicamente por sus diferentes conductancias al K^+ , además de tener distinto voltaje, sensibilidad farmacológica y diferentes roles funcionales. El canal Maxi-K (o BK) es llamado así por su gran conductancia: 100-250 pS en soluciones simétricas de 100 mM de K^+ . Este es activado por la despolarización y las concentraciones micromolares de Ca^{2+} . Los canales de pequeña conductancia SK (5-20 pS) y mediana conductancia MK (20-80pS) no son sensibles al voltaje, sin embargo son activados por concentraciones submicromolares de Ca^{2+} .

La estructura general de los canales SK e MK es similar a la de los canales de K^+ dependientes de voltaje de la familia *Shaker* anteriormente descrita, contiene seis segmentos transmembranales (S1-S6) y la región que forma el poro y el filtro de selectividad está delimitada por los segmentos S5 y S6 unidos por el asa H5.

1.1.2.2. Biología molecular y diversidad

El canal de K^+ dependiente de Ca^{2+} de alta conductancia (BK, Maxi-K o $K_{Ca1.1}$) fue el primer canal de K^+ dependiente de Ca^{2+} identificado. Posteriormente, los tres miembros de conductancia pequeña (SK) de la familia de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} : SK1 ($K_{Ca2.1}$), SK2 ($K_{Ca2.2}$) y SK3 ($K_{Ca2.3}$) fueron clonados en el año de 1996 por

Adelman y colaboradores, poco después fue clonado el canal de conductancia media (MK, SK4 o $K_{Ca3.1}$). En la actualidad se han identificado los variantes de procesamiento alternativo para los tres genes de los canales SK. Por ejemplo, en cerebro de ratón se identificaron 16 polipeptidos distintos producidos por procesamiento alternativo de SK1 y dos subunidades α en SK2 con el N-terminal de diferente longitud. Para SK3 se describieron tres variantes de procesamiento alternativo, dos de los cuales pueden ser hallados en cerebro de humano.

1.1.2.3. Canal de potasio dependiente de calcio Maxi-K

Este canal de alta conductancia ha sido identificado en numerosos tejidos y se ha asociado con procesos fisiológicos como; la repolarización de potenciales de acción en neuronas, la regulación de secreción de fluidos en células exócrinas y en el mantenimiento del tono del músculo liso (Latorre *et al.*, 2000). El canal de K^+ (Maxi-K) está ubicuamente distribuido entre tejidos, excepto en miocitos cardiacos. Su actividad es disparada por la despolarización y potencializada por un incremento de Ca^{2+} en el citosol, haciendo un enlace entre el metabolismo y el estado eléctrico de las células. Por otra parte su función en procesos celulares, ha sido determinada en muchos casos usando toxinas que actúan como bloqueadores específicos del canal como iberiotoxina (Jan *et al.*, 1997).

El canal Maxi-K fue clonado por primera vez en *Drosophila*; la secuencia demostró que pertenecen a la superfamilia de canales K_v (Jan *et al.*, 1997; Kaczorowski *et al.*, 1996). La purificación bioquímica del canal Maxi-K en músculo esquelético demostró que son proteínas complejas formadas por dos subunidades diferentes; la subunidad formadora del poro (subunidad α) y una subunidad reguladora (subunidad β) (Jan *et al.*, 1997).

El componente molecular mínimo necesario y suficiente para la actividad de los canal es la subunidad α formadora del poro. Los canales funcionales son formados por tetrámeros de estas proteínas (subunidades α). La presencia de un cuarto segmento transmembranal cargado positivamente hace que el canal Maxi-K sea miembros de la superfamilia S4. Muchos miembros de esta superfamilia tienen seis segmentos transmembranales (S1-S6), pero el canal Maxi-K tienen un séptimo segmento transmembranal en el NH_2 terminal llamado S0. Así el NH_2 terminal de la proteína se encuentra en la parte extracelular de la membrana (Figura 5). El dominio intracelular COOH terminal, comprende dos tercios de la proteína. El dominio del poro del canal es el asa localizada en la región entre el segmento S5 y S6. El segmento S4 es el sensor de voltaje y es quien actúa como gatillo para disparar la actividad de los canales K_{Ca} como en todos los canales K_{V} (Latorre *et al.*, 2000).

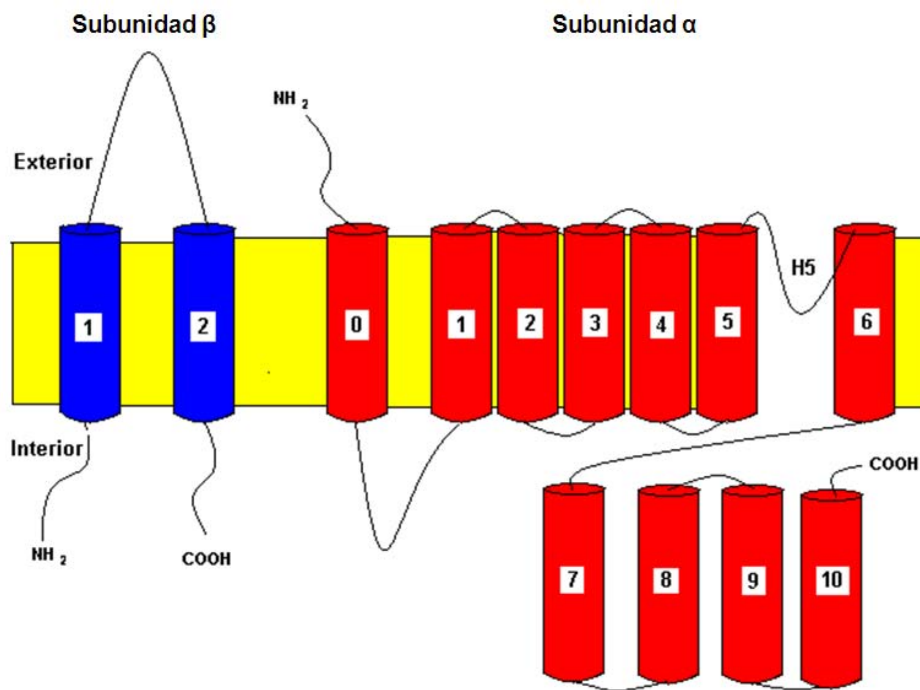


Figura 5. Esquema de la estructura de la subunidad α y β del canal Maxi-K. El canal funcional está formado por 4 subunidades α y probablemente 4 subunidades β .

1.1.3. Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje Ca_v

La vía más importante para la entrada de Ca^{2+} en las células excitables son los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v). Al abrirse, permiten el flujo selectivo de iones Ca^{2+} al interior celular a través del poro del canal, iniciando una variedad de procesos intracelulares como son: la contracción muscular, la secreción de neurotransmisores, la expresión génica, la modulación de la excitabilidad de la membrana y el crecimiento de neuritas, entre otras.

1.1.3.1. Clasificación y estructura

Se han descrito seis tipos funcionales de canales de Ca^{2+} (Zhang *et al.*, 1993), denominados T, L, N, P, Q y R. Estos canales se pueden clasificar de acuerdo a sus propiedades biofísicas y farmacológicas. Sin embargo, la clasificación más utilizada se basa en el rango de voltaje necesario para su activación, clasificándolos en dos categorías: canales de Ca^{2+} de bajo (LVA) y de alto umbral (HVA).

Los canales de calcio son proteínas oligoméricas, constituidos por una subunidad principal α_1 , que sirve como poro y sensor del cambio de potencial (Catterall, 1991) y diversas subunidades reguladoras o auxiliares tales como la subunidad β , la subunidad δ con una región transmembranal que se asocia a la subunidad α_2 en el dominio extracelular y dependiendo del tejido, una quinta subunidad, la subunidad γ del músculo esquelético (Birnbaumer *et al.*, 1994). La subunidad α , está constituida por 4 dominios (I-IV), los que a su vez están formados por 6 segmentos transmembranales. El cuarto de estos segmentos, S4, está altamente cargado positivamente y se considera que es la zona que actúa como sensor de los cambios de potencial de la membrana (Figura 6). El asa que une el quinto y sexto segmento, forma también parte del poro del canal (McCleskey, 1994).

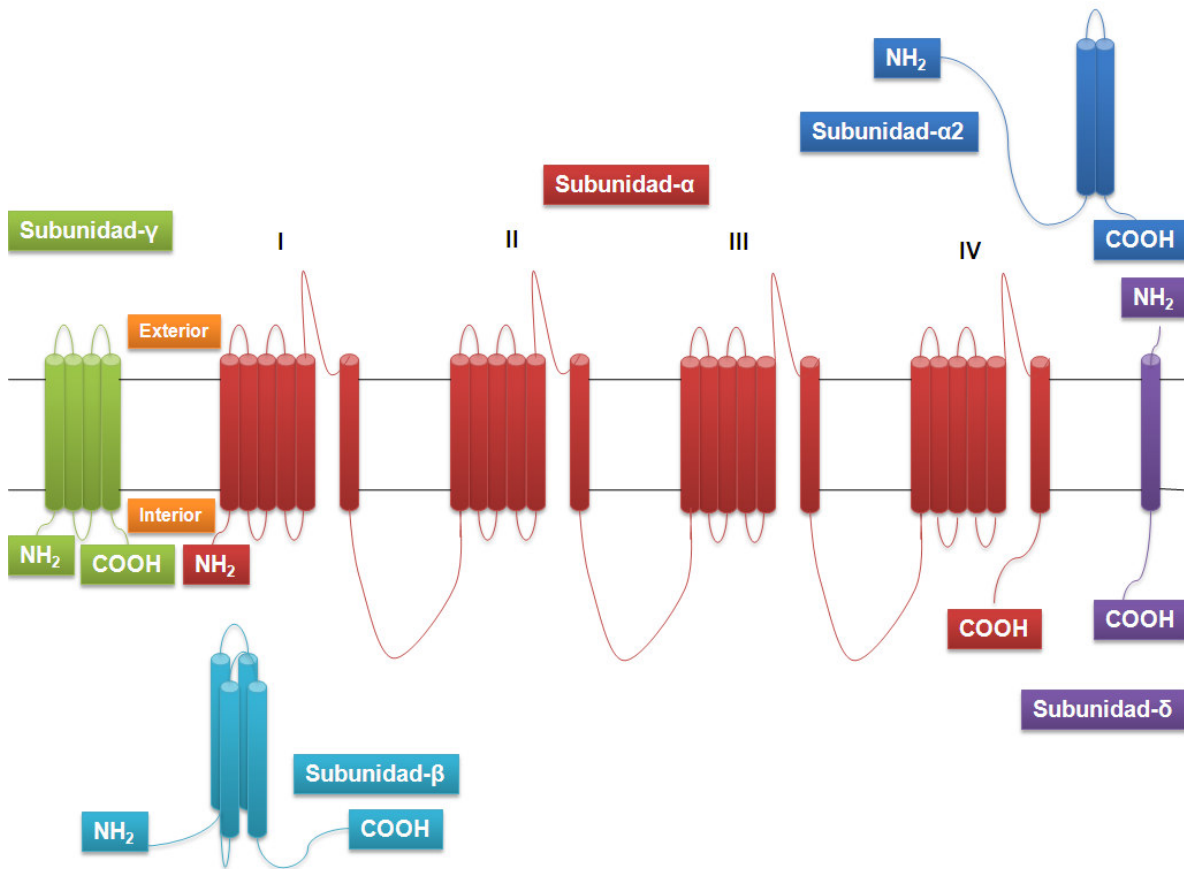


Figura 6. Esquema de las cinco subunidades de canales de Ca^{2+} . Topología putativa de las subunidades α_1 , α_2/δ , β y γ de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje.

1.1.3.2. Biología molecular y diversidad

La biología molecular de los canales de Ca^{2+} tiene su origen en la caracterización bioquímica del receptor de dihidropiridinas (DHP) en el músculo esquelético. Estos estudios establecieron que el receptor del canal de DHP era un complejo de varias subunidades compuesto por la subunidad α_1 (formadora del poro) y pequeñas subunidades accesorias (α_2 , β y γ) (Campbell *et al.*, 1988). La clonación y secuenciación de los cDNAs permitió disponer de las sondas para el descubrimiento de la diversidad de canales de Ca^{2+} que hoy se conoce.

1.1.3.3. Canales de Ca^{2+} de la familia Ca_v1

Los canales Ca_v1 o de tipo L son los mejores estudiados y se encuentran ampliamente distribuidos en todas las células excitables y en la mayoría de las células no excitables. Constituyen la principal vía de entrada de iones Ca^{2+} en las células de los músculos cardíaco, esquelético y liso, y, contribuyen de forma significativa a controlar la secreción de neurotransmisores y los mecanismos de acoplamiento de excitación, contracción en las células neuroendocrinas, en algunas preparaciones neuronales y en las células musculares.

1.1.4. Farmacología de los canales iónicos

Los estudios farmacológicos han sido esenciales para el conocimiento de la actividad de los canales iónicos y para su clasificación e identificación. El descubrimiento de toxinas, como la tetrodotoxina y saxitoxina, y su utilización en el campo de la biofísica, demostró que los canales de sodio y potasio eran entidades moleculares separadas (Narahashi *et al.*, 1964; Hille, 1968). De hecho, la mayor parte del conocimiento actual de la arquitectura de los canales ha sido fruto de experimentos farmacológicos y uno de los objetivos más perseguidos en este campo es encontrar compuestos cada vez más potentes y selectivos. Por otro lado, siendo las funciones de los canales iónicos tan diversas y a la vez tan decisivas para el funcionamiento correcto del organismo, no es de extrañar que la fuente principal de inhibidores de canales esté en la naturaleza, y en concreto en las toxinas peptídicas.

1.1.4.1. Bloqueadores de canales de la familia K_v1

En la actualidad se conocen pocos inhibidores específicos que actúan sobre un solo miembro de la familia *shaker* (K_v1) como la margatoxina (MgTx), una toxina proveniente del veneno del escorpión *Centruroides margaritatus* (García-Calvo *et al.*, 1993). La MgTx

bloquea específicamente al canal $K_v1.3$, pero además también bloquea otros miembros de la familia *Shaker* como $K_v1.1$, -1.2 y -1.6 a bajas concentraciones. Otros bloqueadores de canales de K^+ como el tetraetilamonio (TEA), un compuesto de amonio cuaternario usado experimentalmente, es un bloqueador clásico poco específico de los canales de K^+ , sin embargo, es muy recurrido junto con otros dos bloqueadores como: la 4-aminopiridina (4-AP), α -dendrotoxina (DTx) y la quinidina para medir el requerimiento de la actividad de los canales de K^+ en distintas funciones celulares y en diferentes líneas celulares (Wonderlin y Strobl, 1996).

1.1.4.2. Bloqueadores del canal Maxi-K

El canal Maxi-K también se bloquea por TEA, pero además por otro tipo de bloqueadores incluyendo la tubocurarina, caribdotoxina (Chtx), noxiustoxina y el Ba^{2+} . En estudios recientes se ha demostrado que el canal Maxi-K es bloqueado preferentemente a 2 mM de TEA (Vogalis F *et al.*, 2005). Por otra parte la caribdotoxina, es un polipéptido aislado del veneno del escorpión *Lejurus quinquestriatus*, muy útil en el estudio de los canales K_{Ca} . La caribdotoxina bloquea el canal Maxi-K en una gran diversidad de células (Miller *et al.*, 1985; Storm, 1987). En neuronas del hipocampo de rata prolonga la duración del potencial de acción, lo que indica que el canal Maxi-K está involucrado en la fase de repolarización de éste (Storm, 1987). En la mayoría de los casos actúa en el rango nanomolar, uniéndose a la cara interna del canal.

1.1.4.3. Bloqueadores de canales de la familia Ca_v1

La farmacología de este tipo de canales es de gran importancia debido al éxito alcanzado en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, neurológicas, gastrointestinales, etc. (Fisher y Grotta, 1993) con fármacos bloqueantes de los canales de Ca^{2+} de tipo L, (Fleckenstein-Grün *et al.*, 1984). Estos fármacos constituyen un grupo

heterogéneo de compuestos y han sido clasificados atendiendo a su estructura química en 4 grupos: 1,4-dihidropiridinas (DHP) (nifedipina, nitrendipina, nimodipina, etc.), benzotiazepinas (diltiazem), fenilalquilaminas (verapamil) y piperacinas (flunaricina, cinaricina, etc.). Se unen específicamente a receptores acoplados alostéricamente a la subunidad α , del canal. Las DHP por su especificidad y potencia han sido utilizadas como ligandos para la localización, aislamiento y purificación de los canales de tipo L en músculo esquelético (Curtis y Catterall, 1984; Tanabe *et al.*, 1987) y para los estudios de inhibición y activación de estos canales en células cromafines (Ceña *et al.*, 1989).

1.2. Canales de K^+ y de Ca^{2+} en el fenómeno de la proliferación celular

1.2.1. Canales de K^+ en la proliferación celular

A pesar de que no se conoce exactamente el mecanismo por el que los canales de potasio participan en la proliferación celular, se sabe que estas proteínas son requeridas durante este proceso. Una de las pruebas de esto es que el bloqueo de estos canales disminuye la proliferación celular, tanto en modelos fisiológicos, como en aquellos donde la proliferación es una manifestación patológica (Wonderlin y Strobl, 1996). Los bloqueadores de canales de K^+ inhiben la proliferación en diferentes tipos celulares, incluyendo células de Schwann (Chiu y Wilson, 1989), neuroblastoma (Rouzaire-Dubois *et al.*, 1993), adipocitos (Pappone y Ortiz-Miranda, 1993) y melanoma (Nilius y Wohlrab, 1992; Lepple-Wienhues *et al.*, 1993).

En lo que se refiere a la participación de estas proteínas durante el proceso, se apuntan dos posibles funciones. Por un lado se sabe que durante la fase G1 del ciclo celular se produce una hiperpolarización de la célula que permite tanto una correcta señalización por calcio, necesaria para la proliferación (Nilius *et al.*, 1993), como el transporte dependiente de sodio de metabolitos necesarios para el paso de G1 a fase S (Villereal y Cook, 1978). Por otro lado, las células aumentan de volumen durante la fase

G1 del ciclo, y como ya se ha descrito, los canales de potasio participan en la regulación del volumen celular (Lang *et al.*, 2000). No sólo resulta complicado esclarecer las funciones de estas proteínas en la proliferación, sino que debido a la falta de inhibidores selectivos de canales de potasio, se han identificado pocos canales que participen directamente en este proceso, como son los canales K_v1 de la familia *Shaker*.

1.2.1.1. Canales de las familias K_v1 y K_{Ca} en la proliferación celular

En la actualidad existen numerosos estudios en donde se han visto involucrados los canales de potasio dependientes de voltaje de la familia K_v1 en la proliferación celular. Por ejemplo; durante el desarrollo del sistema nervioso central (SNC), la proliferación celular de oligodendrocitos progenitores (OP) es determinada por la participación de algunos miembros de los canales K_v1 (Vautier F *et al.*, 2004). En este estudio se transfectaron células OP con las subunidades de los canales $K_v1.3$, -1.4 , -1.5 y -1.6 para sobre expresarlos y ver su participación en la proliferación celular de estas células, además se determinó el proceso antiproliferativo mediante la aplicación de bloqueadores de canales de K^+ como MgTx y DTx proponiendo el esquema de la figura 7.

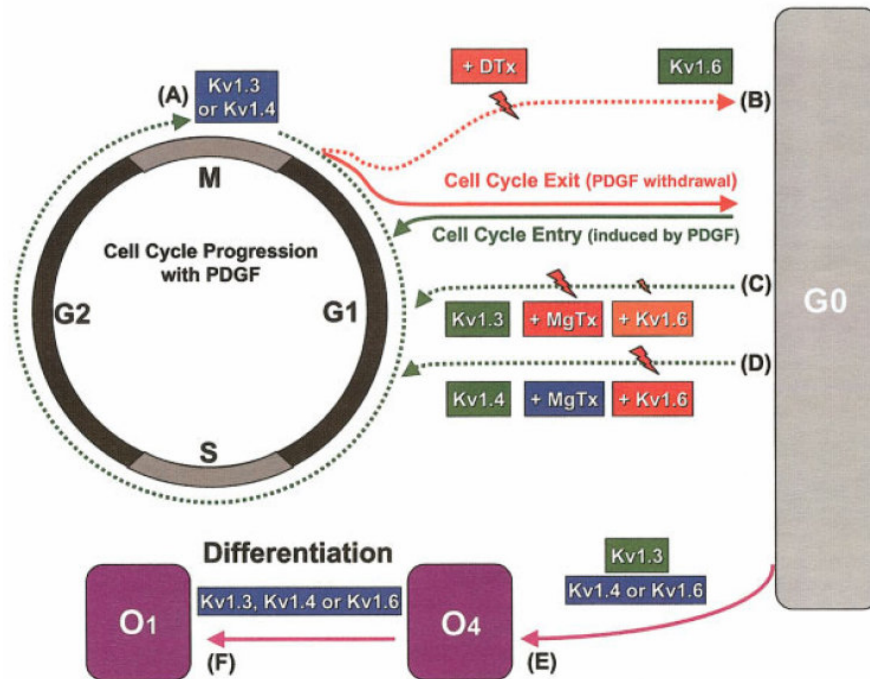


Figura 7. Esquema que ilustra la probable función de algunos de los canales de la familia K_v1 en OP en proliferación y diferenciación celular. A) La sobre expresión de $K_v1.3$ y -1.4 no tienen efecto sobre las células OP cuando son tratadas con el factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF) el cual induce el ciclo celular. B) La sobre expresión de $K_v1.6$ causa la salida del ciclo celular en la fase G0. Este efecto es completamente antagonizado por DTx. C, D) La sobre expresión de $K_v1.3$ y -1.4 hace que las células OP restablezcan el ciclo celular y proliferen similarmente como con PDGF. La MgTx inhibe el ciclo celular y solo se restablece al sobre expresar $K_v1.3$. E, F) La sobre expresión de $K_v1.4$ y -1.6 no afectan este proceso. Sin embargo un incremento pequeño del número de células OP de 4 días (O4) es evidente con la sobre expresión de $K_v1.3$. En células diferenciadas de un día (O1) no ocurre ningún efecto. Tomado de: Vautier F *et al.*, 2004.

Por otra parte, se ha determinado que el canal $K_v1.1$ otro miembro de la familia K_v1 , está presente e involucrado en la proliferación de células epiteliales gástricas (RGM-1) al inhibir su expresión, por medio de RNA interferentes (RNAi) específicos para $K_v1.1$ (Ka-Kei *et al.*, 2006). Por otro lado, algunos investigadores han reportado la expresión de los canales $K_v1.2$, -1.4 , -1.5 y -1.6 en oligodendrocitos (OLGs) y OP, siendo los canales $K_v1.5$ y -1.6 los que contribuyen en la actividad eléctrica de estas células. Finalmente en este estudio se reporta que la inhibición de la proliferación de las células OP, se consigue únicamente al aplicar bloqueadores de canales de K^+ (Quinidina, clofilium y 4-AP) a diferentes concentraciones, y no por la inhibición específica de los canales $K_v1.5$ y -1.6 por medio de oligonucleótidos antisentido, sugiriendo que la inhibición de otros canales K_v

es necesaria para que las células OP transiten por el ciclo celular (Attali *et al.*, 1997). En otros estudios se ha acumulado gran evidencia acerca de la importancia que tienen los canales de potasio K_v en la regulación de la proliferación celular de tumores, como es el caso del cáncer de ovario (Weng *et al.*, 2007) en donde el bloqueador 4-AP inhibe significativamente la proliferación de las células A2780 (línea celular de cáncer de ovario humano). Por otra parte, de manera general se ha visto que los canales de potasio K_{Ca} , participan en la proliferación celular de algunos tejidos, pero con menor frecuencia que los canales de potasio K_v1 , por lo que los canales de potasio K_{Ca} , también podrían estar regulando la progresión durante la fase G1 del ciclo celular. En fibroblastos tratados previamente con estímulos mutagénicos, la inhibición de los canales de potasio K_{Ca} se logra al aplicar el bloqueador ChTx, y esto provoca la inhibición de la proliferación celular de estas células (Archer *et al.*, 1994). Adicionalmente, en la línea celular de cáncer de ovario de humano (A2780), el bloqueador ChTx, no tiene ningún efecto sobre la proliferación de estas células, sugiriendo que los canales de potasio K_{Ca} no son importantes en la proliferación de este tejido (Weng *et al.*, 2007). En otros tipos celulares como MCF-7 (células de cáncer de mama), se ha determinado que los canales de potasio K_{Ca} son críticos en la proliferación de este tejido (Strobl *et al.*, 1995).

1.2.2. Canales de calcio de la familia Ca_v1 en la proliferación celular

El calcio es parte integral de un gran número de vías reguladoras del control de las funciones celulares específicas (Whitfield *et al.*, 1995). El calcio liberado de los almacenamientos internos por el inositol-3-fosfato (InsP3) marca el comienzo de la fase G1 en el ciclo celular (Lu *et al.*, 2001; Whitfield *et al.*, 1995). Por lo tanto, los niveles de calcio intracelular son importantes para la proliferación (Silver, 1999).

Los canales de calcio dependientes de voltaje (Ca_v) son rutas importantes para la entrada de calcio a las células en respuesta a la despolarización de la membrana,

regulando procesos como la contracción, secreción y expresión de genes en muchos tipos de tejidos celulares (Akaike *et al*, 1981; McRory *et al*, 2001).

La expresión de los canales Ca_v de tipo L ha sido reportada durante varios eventos biológicos, incluyendo la diferenciación y proliferación celular (Kuga *et al*, 1996; Panner *et al.*, 2005). Kuga y cols., demostraron la dependencia de la expresión de los canales de calcio Ca_v de tipo L durante la proliferación y diferenciación celular, comprobando su expresión en todas las fases del ciclo celular. Por lo tanto, los canales de calcio de tipo L son importantes reguladores del calcio que participa en los eventos intracelulares que gobiernan el crecimiento y la diferenciación celular.

1.3. Identificación molecular de canales de K^+ expresados en la línea celular MDCK

La identificación de canales iónicos es el primer paso para determinar cual ó cuales de ellos podrían estar implicados en cierta función celular, en nuestro particular interés en la proliferación y diferenciación celular. Una vez conociendo qué canales iónicos están presentes en las células de interés, el siguiente paso es agregar al cultivo celular diferentes concentraciones de toxinas que bloqueen específicamente la función de un canal ó de una población de canales iónicos que previamente fue ó fueron identificados, si las células dejan de crecer, significa que algún ó algunos canales iónicos están implicados en la proliferación celular. Wonderlin y Strobl en el año de 1996, propusieron que todas las células de manera general no deberían proliferar al agregar bloqueadores de canales de K^+ como el TEA, ya que este bloqueador despolariza la membrana celular y suprime la proliferación.

En un estudio reciente se identificó la expresión de cuatro canales de K^+ en las células MDCK. La identificación fue realizada por medio de RT-PCR. Los canales identificados fueron $K_v1.4$, -1.6, -1.7 y Maxi-K como se indica en la figura 8. Se realizó RT-PCR semicuantitativa y se observó que los niveles de RNAm de los canales $K_v1.6$, -1.7 y

Maxi-K son distintos a diferentes horas de crecimiento a confluencia como se indica en la figura 9.

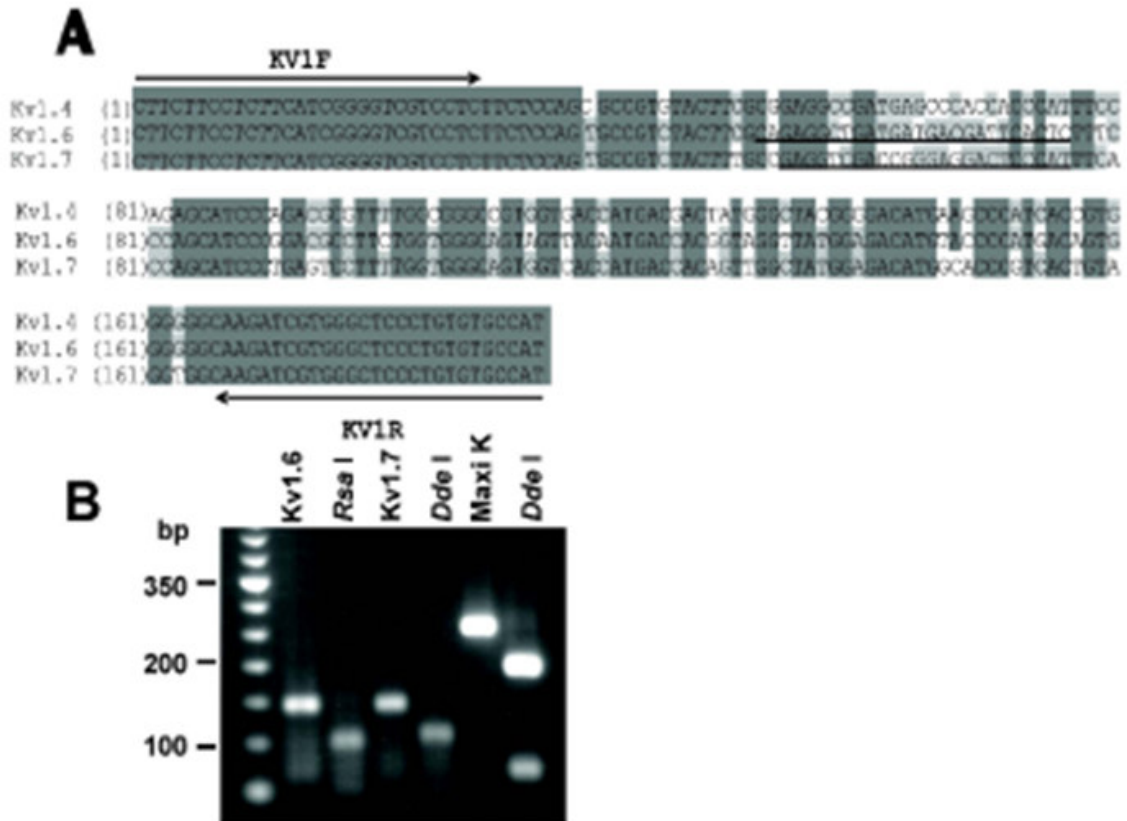


Figura 8. Expresión de RNA mensajeros de cuatro diferentes canales de K^+ en las células MDCK. A) Alineamiento de los canales $K_v1.4$, -1.6 y -1.7 amplificados con los oligonucleótidos KV1F-KV1R. B) Amplificación específica por PCR del RNAm del canal $K_v1.6$, junto con los fragmentos obtenido por restricción con la enzima *Rsa* I (96 y 46 pb) y amplificación por PCR del RNAm del canal $K_v1.7$ y los fragmentos obtenido después de la restricción con la enzima *Dde* I (102 y 38 pb). La imagen también muestra la amplificación por PCR del canal Maxi-K y los fragmentos obtenidos por restricción con la enzima *Dde* I (186 y 64 pb). Tomado de: García-Villegas *et al.*, 2007.

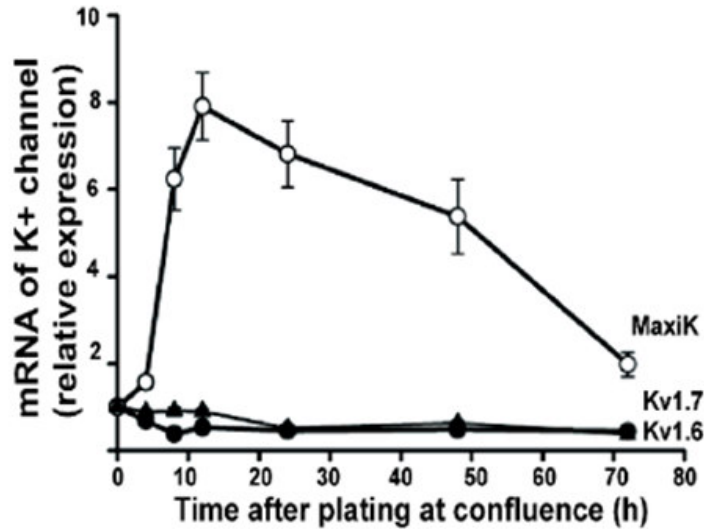


Figura 9. Expresión de los RNA mensajeros de los canales de K⁺. Nivel de expresión del RNAm de los canales Kv1.6, -1.7 y Maxi-K después de confluencia. Tomado de: García-Villegas *et al.*, 2007.

Posteriormente se les agregó a las células MDCK el bloqueador de canales de K⁺: ChTx a 10 nM y TEA a 2 y 10 mM por separado. Sin embargo, estos tratamientos no afectaron la síntesis del canal Maxi-K, ni la diferenciación celular medida por el desarrollo del fenotipo epitelial (García-Villegas *et al.*, 2007). Por lo que el estudio demostró que los canales de K⁺: K_v1.4, -1.6, -1.7 y Maxi-K se expresan en las células MDCK, pero no son indispensables para la diferenciación ni para la proliferación celular.

Por lo que las células MDCK no son un buen modelo de estudio para determinar los mecanismos por los cuales los canales de K⁺ regulan la proliferación y diferenciación celular. Actualmente en el laboratorio contamos con células derivadas del epitelio corneal de conejo (RCE1), las cuales fueron empleadas para realizar el presente estudio.

1.4. Epitelio corneal

El epitelio corneal como barrera física, previene la entrada de agentes nocivos que infectan este tejido. De igual manera, sirve para proteger el interior del tejido ocular del ambiente. Estas funciones protectoras del epitelio corneal, le dan la capacidad de sufrir continuas renovaciones para remplazar los estratos diferenciados que se encuentran en la parte superficial. El transporte iónico activo a través del epitelio corneal, contribuye de manera importante al mantenimiento de los gradientes osmóticos (Klyce y Wong, 1977; Wolosin y Candia, 1987).

1.4.1. Identificación de canales de K^+ en el epitelio corneal

En el epitelio corneal se han realizado numerosos estudios para determinar que canales iónicos se están expresando en este tejido. Por ejemplo, en células de epitelio corneal de conejo y humano se ha reportado la presencia de canales de potasio K_v en la membrana apical de los estratos superficiales, y una gran conductancia a K^+ (160 pS) en el estrato celular basal (Rae, 1985; Rae *et al.*, 1990, Rae *et al.*, 1992). Wang *et al.*, en el 2004 demostraron que el canal $K_v3.4$ es altamente expresado en la membrana celular, al usar un anticuerpo anti- $K_v3.4$ en células epiteliales de cornea de rata. Además, lograron inhibir las corrientes de K^+ de estas células en presencia de 4-AP ó bien de α -DTx. Por otro lado, se ha detectado la expresión del RNAm del canal K_v (Kir2.1) en epitelio corneal y se ha caracterizado su corriente iónica (Rae y Shepard, 2000). Sin embargo, aún no se conoce la diversidad de canales iónicos que está participando en la renovación de este tejido y aún es menos conocida la función que desempeña cada uno de ellos en el fenómeno de proliferación celular.

1.4.2. El epitelio corneal como modelo en la proliferación celular

Las células de epitelio corneal se pueden usar para estudiar los mecanismos moleculares y celulares relacionados a la proliferación y diferenciación de este tejido, ya que si se obtienen cultivos primarios, se puede reproducir *in vitro* la formación de un epitelio estratificado de varias capas celulares. En la figura 10 A se muestra un cultivo primario de células de epitelio corneal que al ser disgregadas y sembradas forman colonias con actividad mitótica, las cuales tienen la morfología típica del epitelio corneal. En la figura 10 B se observan las células después de 5 días de cultivo. Estas células están totalmente en confluencia, pero además, ya está formada la estructura estratificada de 4 a 5 capas y características del epitelio corneal original (Figura 10 C) (Hernández-Quintero *et al.*, 2002).

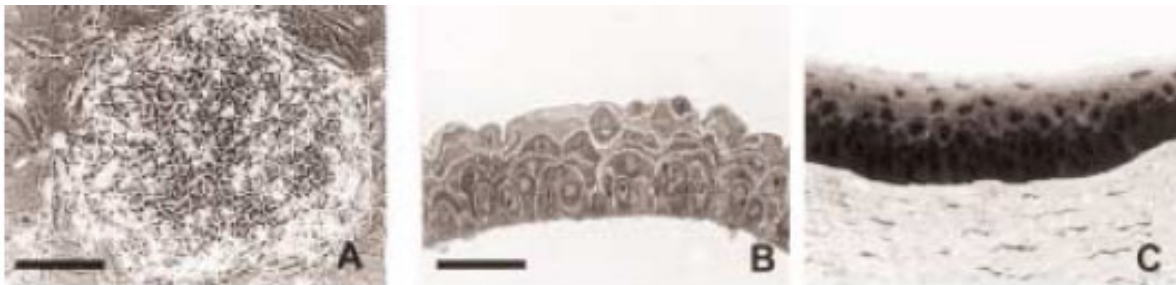


Figura 10. Morfología del epitelio corneal. A) Colonia de epitelio corneal después de 4 días de crecimiento en el cultivo celular. B) Corte transversal del cultivo de epitelio corneal a los 5 días de post-confluencia, en donde se muestra la estructura estratificada. C) Corte transversal del tejido de epitelio corneal de conejo. Tomado de: Hernández-Quintero *et al.*, 2002.

En estudios recientes, fue determinado el nivel de expresión de las enzimas lactato deshidrogenasas LDH-H y LDH-M a diferentes días de cultivo (Hernández-Quintero *et al.*, 2002), además estas enzimas fueron propuestas como marcadores de diferenciación tempranos en las células de epitelio corneal, ya que su nivel de expresión incrementaba considerablemente en cultivos estratificados en confluencia (12 días de cultivo) como se indica en la figura 11.

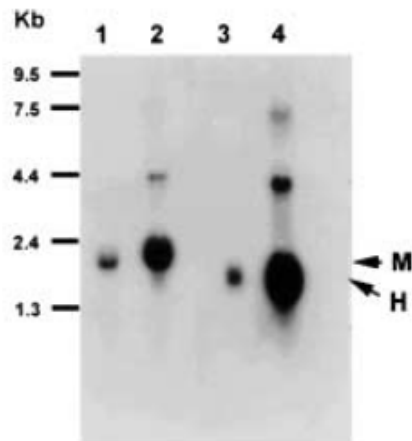


Figura 11. Inducción del RNAm de la LDH-M y LDH-H durante la diferenciación del epitelio corneal. El RNAm fue obtenido de células en proliferación (4 días de cultivo. Línea 1 y 3) ó cultivos estratificados en confluencia (12 días de cultivo. Líneas 2 y 4). Tomado de: Hernández-Quintero *et al.*, 2002.

1.4.3. Células RCE1

Las células RCE1 son derivadas del epitelio corneal de conejo, estas células a mediados de los 90' fueron propuestas como un buen modelo para el estudio de la proliferación y diferenciación celular del epitelio corneal, ya que se halló que a los 5 días de cultivo (post-confluencia) expresan altos niveles de marcadores de diferenciación (Castro-Muñozledo F, 1994) como las queratinas K3 y K12 al realizar análisis de inmunoblot (Figura 12).

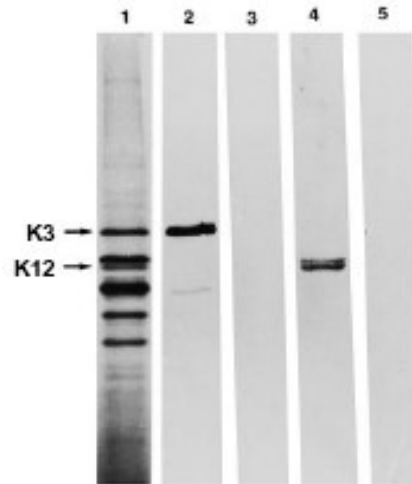


Figura 12. Análisis de inmunoblot de las queratinas K3 y K12 de RCE1. Las queratinas fueron extraídas de estratos celulares RCE1 de 5 días de cultivo. Carril 1, diferentes citoqueratinas presentes en células RCE1 (tinción con azul de coomasie). Carril 2, inmunodetección con un anticuerpo anti-queratina K3. Carril 4, inmunodetección de la queratina K12.

Al mismo tiempo, se realizaron estudios que demostraron que las células RCE1 cumplen con los criterios básicos que son considerados en estudios de diferenciación celular. Las células RCE1 mostraron propiedades de crecimiento similares a las encontradas en cultivos primarios de queratinocitos corneales. Además se demostró que después de crecer a confluencia, las células RCE1 son capaces de organizar de tres a cinco láminas el epitelio estratificado con muchas de las características mostradas por el epitelio corneal. Estos hallazgos sugirieron una alta similitud entre las células RCE1 y cultivos primarios de células de epitelio corneal (Castro-Muñozledo F, 1994). Por lo tanto, la línea celular RCE1, es una línea celular espontánea establecida a partir de epitelio corneal de conejo, la cual después de crecer a confluencia, empieza a estratificarse y nos da la ventaja de recapitular *in vitro* los primeros estadios de diferenciación del epitelio corneal.

Recientemente en nuestro grupo de investigación se ha estudiado en la línea celular RCE1 la expresión de RNAm de algunas de las proteínas que se inducen durante la diferenciación del epitelio corneal de conejo, particularmente la expresión del mensajero del gen homeótico Pax 6. Los resultados hasta ahora han demostrado que las células RCE1 expresan tanto el RNA mensajero del factor de transcripción Pax 6, como los mensajeros de las isoformas H y M de la LDH, aumentando su expresión paralelamente en la etapa de estratificación observada *in vitro* en cultivos celulares de RCE1 (Figura 13 A). Por otra parte, también se demostró que las células RCE1 expresan las queratinas K3, K6 y K12 (Figura 13 B). Finalmente se concluyó que la expresión del RNAm de Pax 6 antecede la expresión de los mensajeros de LDH H y M, y de las queratinas K3 y K12 sugiriendo a Pax 6 como un fuerte candidato para regular la diferenciación del epitelio corneal (García-Villegas *et al.*, 2009).

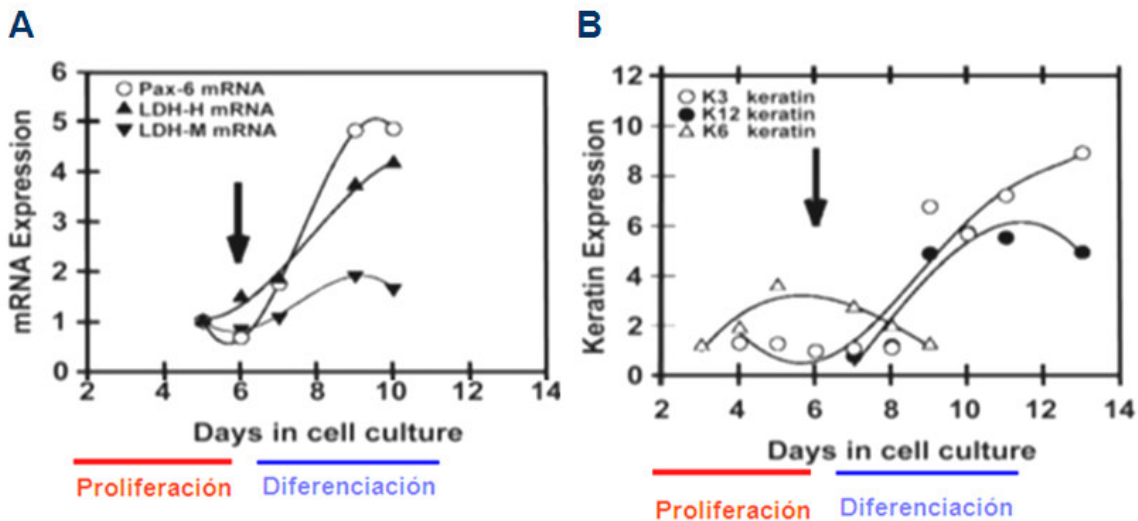


Figura 13. Expresión de RNAm de marcadores de diferenciación a diferentes días de cultivo en RCE1. A) Inducción de los mensajeros Pax 6, LDH-H y LDH-M. A partir del día 6, incrementan su expresión drásticamente. B) Inducción de los mensajeros de las queratinas K3, K12 y K6. La queratina K3 se induce a partir del día 6, mientras la queratina K6 a partir del día 3, pero se expresa solo en la etapa de proliferación celular. La queratina K12 es inducida en el día 7 cuando las células se encuentran ya diferenciadas. Tomado de: García-Villegas *et al.*, 2009.

En resumen, la línea celular RCE1 tiene la capacidad de proliferar *in vitro* en los primeros cinco días de cultivo y al sexto día, cuando alcanza la confluencia, empieza a expresar marcadores de diferenciación como son el factor de transcripción Pax6, las lactato deshidrogenasas LDH-H y LDH-M y las citoqueratinas K3 y K12. Por lo tanto, en el laboratorio conocemos con precisión, cuando las células RCE1 se encuentran en la etapa de proliferación y cuando en la de diferenciación celular, además las características que poseen las células RCE1 son de gran utilidad como modelo celular inmortalizado que permite la manipulación experimental del sistema y la disponibilidad del material biológico en cantidades suficientes.

2. Justificación

Hasta ahora en esta línea celular RCE1, no se habían realizado estudios relacionados con canales iónicos en la proliferación y diferenciación celular, es por esto que en este trabajo nos dimos a la tarea de investigar que canales de K^+ y Ca^{2+} podrían estar expresándose durante estas dos etapas (proliferación y diferenciación) en la línea celular RCE1.

La importancia de analizar la expresión de diferentes canales iónicos dependientes de voltaje de la familia K_v1 , el canal Maxi-K y Ca_v1 en epitelio corneal de conejo y en las células RCE1, es para establecer que tipos de canales K^+ y Ca^{2+} podrían estar participando durante la proliferación celular del epitelio corneal, y así en un futuro, poder evaluar los posibles efectos de cada canal por separado, en la proliferación y diferenciación de estas células.

3. Objetivo general

Identificar el RNAm de canales de K^+ y/o Ca^{2+} expresados en células de epitelio corneal de conejo y de la línea celular RCE1.

4. Objetivos particulares

- ✚ Disecar el epitelio corneal de conejo y aislar su RNAm.
- ✚ Aislar RNAm de la línea celular RCE1.
- ✚ Amplificar canales iónicos por RT-PCR utilizando oligonucleótidos que amplifiquen mensajeros de canales de la familia K_v1 , el canal Maxi-K y Ca_v1 en epitelio corneal de conejo y en la línea celular RCE1.
- ✚ Clonar y secuenciar los fragmentos obtenidos por PCR.
- ✚ Identificar *in silico* las secuencias obtenidas por secuenciación.
- ✚ Diseñar oligonucleótidos específicos que amplifiquen por separado los mensajeros de los canales de la familia K_v1 encontrados en el epitelio corneal de conejo y en la línea celular RCE1.
- ✚ Evaluar el efecto del bloqueador de canales de K^+ (TEA) sobre el crecimiento de las células RCE1.

5. Metodología

5.1. Aislamiento de células de epitelio corneal de conejo (ECC)

El aislamiento de tejido se realizó de acuerdo a Hernández-Quintero *et al.*, 2002. Las células de epitelio corneal se aislaron a partir de las corneas de un conejo albino, de peso entre 2 - 2.5 kg. El animal fue manejado de acuerdo al manual del Instituto Nacional de Salud para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorios, acorde con el Informe para el Uso de Animales en Investigación de Oftalmología y Visión.

El conejo fue sacrificado por inyección intravenosa de solución pentobarbital de sodio (100 mg/kg). Bajo condiciones asépticas, el espacio subcutáneo fue cortado alrededor del margen del párpado. Las corneas fueron seccionadas mediante un corte ecuatorial como se indica en la figura 14 A. Posteriormente las corneas fueron depositadas en un recipiente estéril con buffer de fosfatos (PBS) para ser disecadas (Figura 14 B). La disección consistió en remover cuidadosamente con un bisturí y pinzas de disección los tejidos que se encuentran unidos a la cornea (cristalino, iris, conjuntiva y esclera). Una vez que se tuvo la cornea libre de tejidos adyacentes, se realizó la separación del epitelio corneal mediante rasgados en la superficie de la córnea en forma cuadrangular con un bisturí (Figura 14 C). Posteriormente las corneas fueron depositadas en otro recipiente estéril que contenía buffer PBS y una mezcla (1:1, v/v) de tripsina 0.25% y EDTA 0.02%. Después las corneas fueron incubadas a 37°C por 40 minutos para su posterior disgregación en células únicas por suaves rasgados y pipeteos vigorosos (Figura 14 D). Finalmente las células se observaron al microscopio óptico para verificar su completa disgregación como se indica en la figura 14 E. En caso de que aún falten agregados celulares por disociar, se repiten nuevamente los pipeteos vigorosos hasta separarlos completamente. De la disección celular se obtuvieron aproximadamente 2×10^6 células por córnea que correspondió con lo reportado por Castro-Muñozledo, 2007. El aislamiento de células de ECC fue realizado en el laboratorio del Dr. Federico Castro Muñozledo en el Departamento de Biología Celular del CINVESTAV. Estas células se procesaron para aislar RNA total.

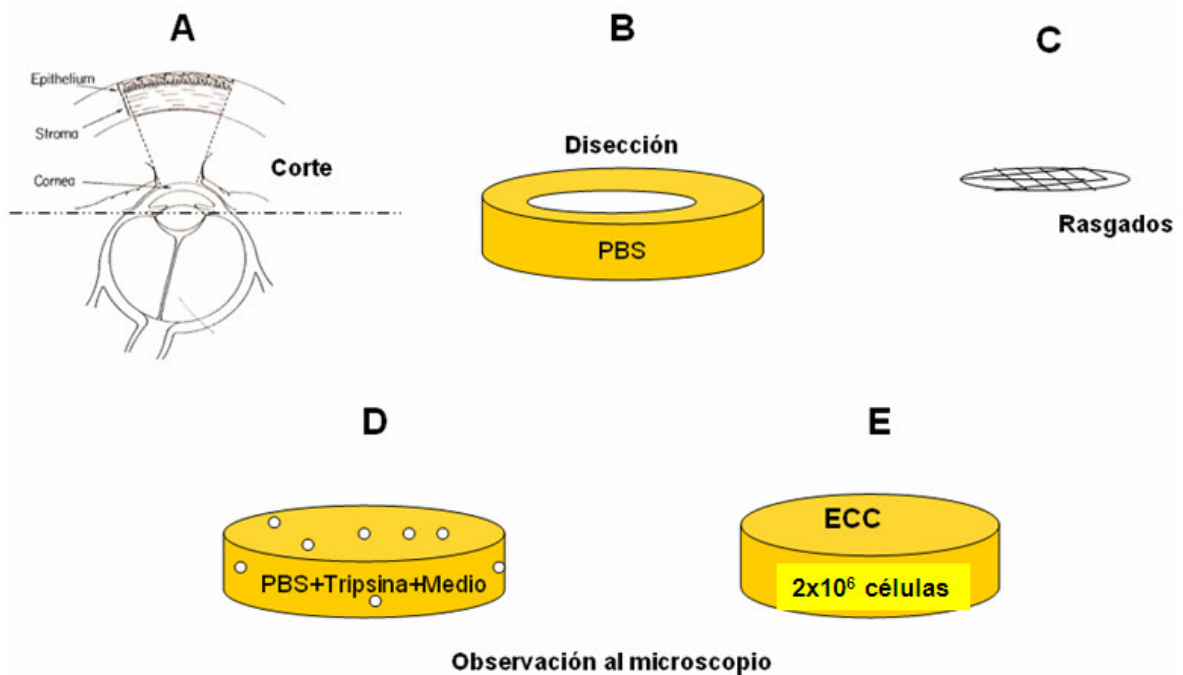


Figura 14. Dissección y aislamiento del epitelio corneal de conejo. A) Se realizó un corte ecuatorial sobre la cornea como se indica con la línea punteada. B) El tejido obtenido se pone en un recipiente con buffer PBS en donde se realiza la dissección del ECC removiendo el cristalino, iris, conjuntiva y esclera. C) El desprendimiento celular se lleva a cabo mediante rasgados sobre el ECC en forma de cuadrícula con un bisturí. D) La disgregación celular se realiza depositando el tejido del paso C en un recipiente con PBS+Tripsina+Medio y se incuban para permitir la separación de las células. E) El último paso consiste en observar las células al microscopio óptico para confirmar que estén completamente separadas.

5.2. Cultivo celular de células RCE1

La línea celular de epitelio corneal RCE1-(5T5) fue obtenida por Castro-Muñozledo, (1994). Las células fueron sembradas a 2.7×10^3 células/cm² junto con 2.2×10^4 células/cm² de células 3T3 tratadas con mitomicina, usando una mezcla (3:1) de nutrientes DMEM/F12-Ham, suplementada con 5% (v/v) de FBS, 5% (v/v) de CS, 5 µg/ml de insulina, 5 µg/ml de transferrina, 0.4 µg/ml de hidrocortisona, 2×10^{-9} M de triiodothyronina, 1×10^{-10} M de toxina de cólera y 24.3 mg/L de adenina (Castro-Muñozledo *et al.*, 1994). En todos los experimentos, los medios fueron cambiados cada 3 días; los cultivos fueron mantenidos en una atmósfera con 10% CO₂ y 90% de humedad.

5.3. Aislamiento de RNA total

Las células de epitelio corneal de conejo (ECC) así como las células RCE1 de 3 y 8 días de cultivo fueron lisadas con solución D (4 M tiocianato de guanidina, 25 mM citraro de sodio pH 7, 0.5 sarkosyl y 1% de β -mercaptoetanol) y se extrajo el RNA total mediante el método descrito por Chomcynski, y Sacchi, (1987). Subsiguientemente, se determinó la concentración de RNA total por densidad óptica (OD) a 260 nm considerando la equivalencia de 1 OD₂₆₀ = 40 μ g/ml de RNA en el espectrofotómetro Beckman, modelo DU 650. Posteriormente se determinó la integridad del RNAm por medio de un gel desnaturalizante de agarosa-formaldehído (Solución de agarosa al 1%: 1 g de agarosa, 10 ml buffer MOPS 10X, 16.7 ml de formaldehído 37% y 73.3 ml de agua Milli Q esterilizada). Las muestras de RNA fueron mezcladas con solución desnaturalizante (50% de formamida, 6% de formaldehído y 2X de MOPS) en proporción 1:3, es decir, a cada volumen de muestra de RNA se le agregó 3 volúmenes de solución desnaturalizante. Las muestras fueron desnaturalizadas durante 15 minutos a 65°C y enfriadas abruptamente en hielo para posteriormente mezclarlas con 2 μ l de buffer con azul de bromofenol y xilen cianol. En seguida las muestras se depositaron en los carriles del gel agarosa-formaldehído y fueron corridas durante toda la noche a 20 V. Después de la corrida, el gel fue teñido con 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio (EtBr) en 0.5 M de acetato de amonio durante 40 minutos.

5.4. Retrotranscripción acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

La RT-PCR se llevó a cabo en dos pasos, para la síntesis de cDNA se usó la transcriptasa reversa, Superscript II (Invitrogen) esta enzima fue usada con oligo dT como primer y después se realizó la PCR para la detección de los diferentes RNAm de interés con la misma muestra de reacción de síntesis de cDNA. A partir de 5 μ g de RNA total se realizó la síntesis de cDNA como se esquematiza en la figura 15. El RNA total (5 μ g) se incubó con 5 μ l de oligo dT 10 μ M y agua libre de RNAsas a 70°C

durante 10 minutos. Posteriormente se agregó 4 μ l de buffer de primera cadena 5X, 2 μ l DTT 0.1 M, 1 μ l dNTP's 10 mM, 0.5 RNAsaOut (volumen final 20 μ l) y fue incubado a 44°C durante 2 minutos, en seguida se agregó 1 μ l de transcriptasa reversa (200 u/ μ l) Superscript II (Invitrogen), y finalmente la reacción fue incubada a 44°C durante 1 hora. Subsiguientemente se procedió a realizar la reacción de PCR.

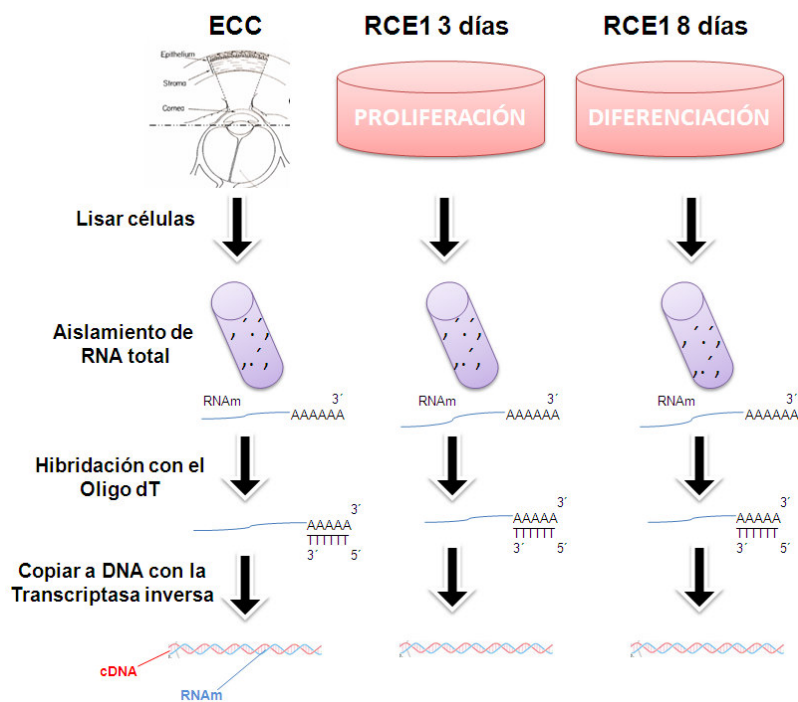


Figura 15. Esquema resumen de la síntesis de cDNA de ECC y células RCE1 de 3 y 8 días de cultivo. En primer lugar las células fueron lisadas. Luego se realizó el aislamiento del RNA total. Después se agregó el oligo dT y finalmente se agregó la transcriptasa reversa para la síntesis de cDNA.

5.4.1. Amplificación por PCR de RNAm de canales de potasio de la familia K_v1

Inicialmente se realizó una reacción de PCR con oligonucleótidos generales que se unen a todos los miembros de la familia de canales de potasio K_v1 . Los oligonucleótidos generales fueron diseñados con base en alineamientos de todos los miembros de la familia K_v1 reportados para humano. Estos oligonucleótidos son; sentido, KV1F: 5'-TTC TTC CTC TTC ATC GGG GTC GTC CT-3' y antisentido, KV1R: 5'-ATG GCA CAC AGG GAG CCC ACG ATC TT (García-Villegas *et al.*, 2007). La amplificación de los canales K_v1 con los oligonucleótidos KV1F-KV1R inicialmente fue

realizada con RNA de células RCE1 de 10 días de cultivo y las condiciones de amplificación fueron: 94°C por 5 minutos y 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y una extensión final de 72°C por 7 minutos. La reacción de PCR fue realizada con: 1 µl de enzima Taq DNA Polimerasa de marca NEW ENGLAND *Bio Labs*, 0.5 µl dNTP's 10X, 5 µl Buffer 10X, 1 µl KV1F 15 mM, 1 µl KV1R 15 mM y 1 µl de la reacción de síntesis de cDNA en 50 µl (volumen final).

Se estandarizaron las condiciones de amplificación a 94°C por 5 minutos y 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 42°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y extensión final 72°C por 7 minutos, y se utilizó 0.5 µl de enzima Taq DNA Polimerasa de alta fidelidad de marca Roche, 0.5 µl dNTP's 10X, 5 µl Buffer 10X, 1 µl KV1F 15 mM, 1 µl KV1R 15 mM y 2 µl de la reacción de síntesis de cDNA en un volumen final de 50 µl. La estandarización de las condiciones de amplificación y el cambio de enzima fue para obtener un amplicón más abundante. El tamaño del producto de la reacción de PCR fue verificado por electroforesis a través de gel de agarosa al 2% como se describe en el apartado 5.7.1.3.

5.5. Diseño de oligonucleótidos específicos de la familia K_v1

Los oligonucleótidos específicos que amplifican a los canales K_v1.1, -1.4 y -1.6 de conejo fueron diseñados con base a las diferencias encontradas al analizar cada secuencia en el programa Vector NTI 7. En la figura 24 del apartado 6.1.4., se muestra el alineamiento de las secuencias de los canales K_v1.1, -1.4 y -1.6 identificados en células RCE1. Los oligonucleótidos específicos diseñados para cada canal están subrayados con flechas delgadas en cada secuencia. Los oligonucleótidos fueron analizados en el programa Oligo Calculator (www.genetics.mgh.harvard.edu/xwang/research/oligo.html). Los oligonucleótidos fueron mandados a sintetizar a Sigma-Aldrich.

5.6. Amplificación por PCR del RNAm de los canales de K⁺ y Ca²⁺

5.6.1. Canales K_V1.1, -1.4 y -1.6.

Para la detección específica de cada uno de los canales K_V identificados en células RCE1, las condiciones de amplificación durante la PCR fueron: 94°C por 5 minutos y 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y una extensión final 72°C por 7 minutos. La reacción se realizó con 0.5 µl de enzima Taq DNA Polymerasa de marca Roche, 1 µl dNTP's 10X, 5 µl Buffer 10X, 1 µl de oligonucleótido específico (CK_V1.1, CK_V1.4 o CK_V1.6) 10 mM, 1 µl KV1R 15 mM y 4 µl cDNA. En la tabla 1 se muestra el resumen de las condiciones de amplificación, así como también el tamaño del fragmento esperado y la secuencia del oligonucleótido que amplifica a cada canal por separado.

RNAm blanco	Secuencia del oligonucleótido	Condiciones de amplificación	cDNA (µl)	Producto RT-PCR
K _V 1.1	CKV1.1F: 5'-CGGAGGAAGCTGAGTCGCAC-3'	60°C x 35 ciclos	4	136 pb
	KV1R: 5'-ATGGCACACAGGGAGCCCACGATCTT-3'			
K _V 1.4	CKV1.4F: 5'-GCAGAGGCGGATGAACCCACTA -3'	60°C x 35 ciclos	4	143 pb
	KV1R: 5'-ATGGCACACAGGGAGCCCACGATCTT-3'			
K _V 1.6	CKV1.6F: 5'-AGGCTGATGACGATGACTCACTT-3'	60°C x 35 ciclos	4	138 pb
	KV1R: 5'-ATGGCACACAGGGAGCCCACGATCTT-3'			
Maxi-K	DsloF: 5'-TGGACCAAGACGATGATGACGACC-3'	60°C x 35 ciclos	4	255 pb
	DsloR: 5'-CGGCAGCGGTCCCTATTGGC-3'			
Ca _V 1	CAV1F: 5'-CATCGGGTCCAGTTCTTCAAGG-3'	60° x 35 ciclos	4	352 pb
	CAV1R: 5'-ATGACGAAGCCCACGAAGATGTT-3'			

Tabla 1. Condiciones de amplificación del RNAm de los canales K_V1.1, -1.4,-1.6, Maxi-K y Ca_V1 por PCR. Se muestra la secuencia de los oligonucleótidos usados, temperatura de alineamiento, número de ciclos y la cantidad inicial de cDNA utilizada en cada análisis de RNAm. Los cuatro µl de cDNA utilizados en cada reacción, fueron a partir de una dilución 1:5 de la reacción de síntesis de cDNA en un volumen final de 25 µl

La amplificación por PCR del RNAm de los canales $K_v1.1$, -1.4 y -1.6 fue realizada a partir de RNAm de ECC y células RCE1 de 8 días de cultivo. Los tamaños de los productos de cada reacción de PCR anteriormente descritos fueron verificados por electroforesis a través de geles de agarosa al 2% como se indica en el apartado 5.7.1.3.

5.6.2. Canal de potasio Maxi-K

Para la amplificación del RNAm del canal de potasio Maxi-K se usaron oligonucleótidos que reconocen una región que no presenta variaciones de procesamiento alternativo que se usó para detectar la expresión del RNAm del canal Maxi-K en células MDCK. La secuencia de los oligonucleótidos y las condiciones de amplificación se muestra en la tabla 1. La reacción de PCR fue realizada a partir de RNAm obtenido de células RCE1 de 3 y 8 días de cultivo con 0.5 μ l de enzima Taq DNA Polymerasa de marca Roche. El tamaño del producto de la reacción de PCR fue verificado por electroforesis a través de gel de agarosa al 2% con se describe en el apartado 5.7.1.3.

5.6.3. Canales de calcio de la familia Ca_v1

Para los canales de calcio dependientes de voltaje de la familia Ca_v1 se emplearon los oligonucleótidos CAV1F-CAV1R (Ver tabla 1), los cuales fueron diseñados con base en alineamientos con todos los miembros de la familia Ca_v1 de secuencias de cDNA reportadas para humano. En la tabla 1 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos y las condiciones de amplificación. La reacción de PCR fue realizada a partir de RNAm obtenido de ECC y células RCE1 de 3 y 8 días de cultivo con 0.5 μ l de enzima Taq DNA Polymerasa de marca Roche. El tamaño de los productos de la reacción de PCR fueron verificados por electroforesis a través de gel de agarosa al 2% como se describe en el apartado 5.7.1.3.

5.7. Clonación, secuenciación e identificación de fragmentos amplificados por PCR

5.7.1. Clonación de fragmentos K_v1 y Maxi-K

Los fragmentos amplificados por PCR; K_v1 y Maxi-K fueron ligados por separado en el vector pGEM-T Easy con el kit pGEM T Easy Vector System de la marca Promega (Figura 16). La mezcla de ligación fue introducida por transformación en bacterias supercompetentes DH 5 α . Se mezcló 100 μ l de bacterias con 10 μ l de la mezcla de ligación y se incubó en baño de hielo-agua durante 30 minutos. Después se les dió un choque térmico al ser incubadas durante 1:45 minutos a 42°C. Luego fueron regresadas al baño de hielo-agua durante 2 minutos y se agregó 900 μ l de medio Luria Bertani (LB) (Para 1 L =10 g. Triptona, 5 g. extracto de levadura y 10 g. NaCl a pH= 7.0).

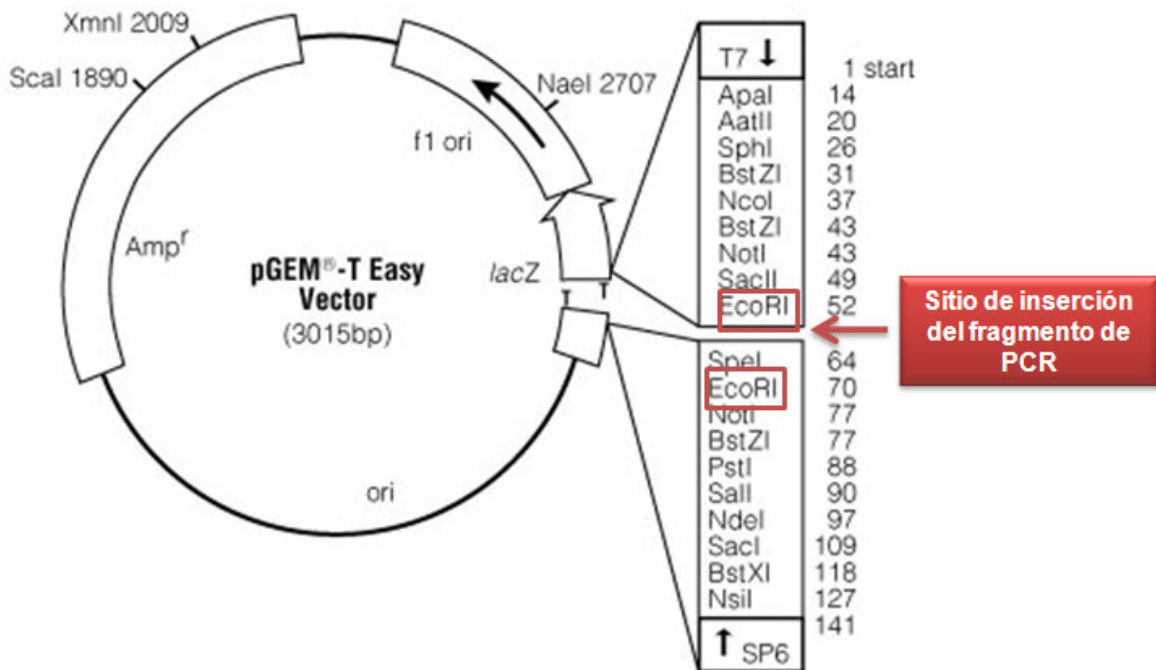


Figura 16. Mapa del vector de clonación pGEM-T Easy. El vector pGEM-T Easy porta el DNA que codifica para el péptido alfa de la Beta-galactosidasa (*lac Z*) bajo el promotor y el operador del operón de lactosa. Además también porta el gen de resistencia a la ampicilina (*Amp^r*). Los sitios de restricción por endonucleasas mostradas, se encuentran flanqueando el sitio de clonación. Los fragmentos de PCR clonados fueron liberados por la endonucleasa Eco RI.

Posteriormente las bacterias fueron incubadas a 37°C con agitación durante 1 hora. Después se sembraron 100 µl de estas bacterias con una mezcla de 40 µl de sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-b-D-galactosido (X-gal) 20 mg/ml y 4 µl de isopropylthiogalactosido (IPTG) en cajas petri con medio LB y ampicilina (Ap) 100 µg/ml. Las cajas fueron incubadas durante toda la noche a 37°C para su selección por α -complementación del gen lac Z. En la figura 17 se muestra el resumen del procedimiento por el cual las bacterias fueron transformadas con la ligación de los fragmentos de PCR en el plásmido pGEM-T Easy y la identificación de colonias bacterianas que contuvieran plásmidos recombinantes.

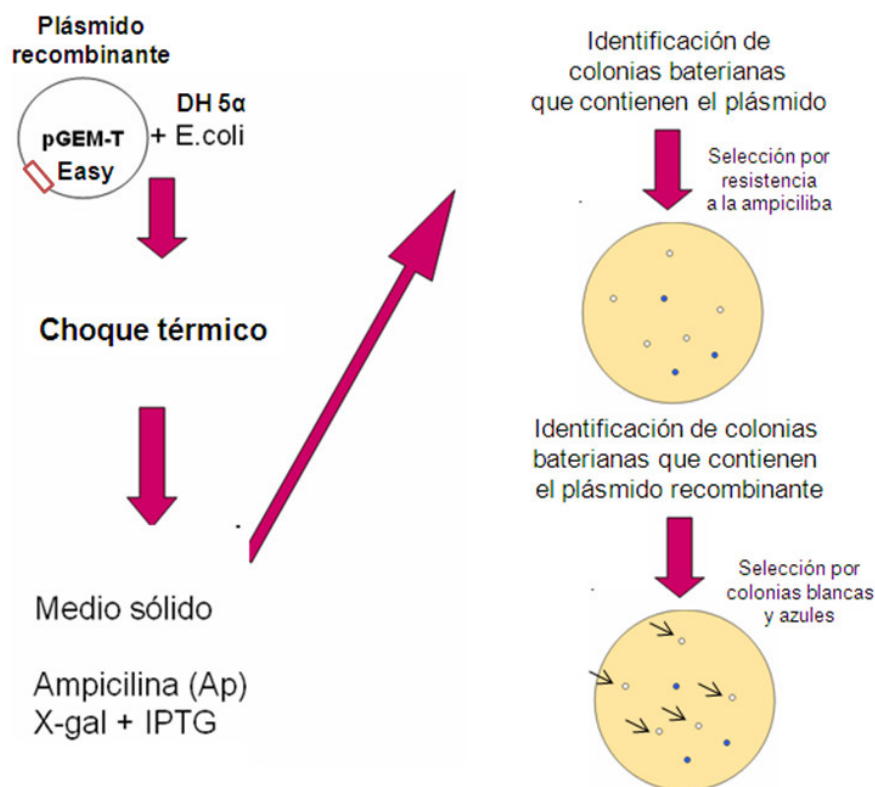


Figura 17. Selección de colonias blancas y azules en medio de ampicilina. En primer lugar el plásmido recombinante pGEM-T Easy se mezcla con bacterias super competentes DH 5 α . Después a la mezcla se le da un choque térmico. Luego se incuba la mezcla transformante con ampicilina, X-gal e IPTG en un medio sólido para su posterior selección por resistencia a la Ap y colonias blancas-azules. Las colonias blancas corresponden a moléculas que incorporan el fragmento de PCR e interrumpen la transcripción del péptido α de lac Z.

Aquellas bacterias que fueron transformadas con el plásmido pGEM-T Easy fueron detectadas, ya que la mezcla de transformación fue sembrada en un medio sólido que

contiene el antibiótico Ap de selección para el cual el plásmido pGEM-T Easy porta el gen de resistencia. La selección por α -complementación o por colonias blancas y azules consistió en seleccionar aquellas colonias que no presentaran coloración (blancas), ya que estas colonias son las que contienen el plásmido pGEM-T Easy con inserto. Una vez seleccionadas las colonias blancas que contienen el plásmido, éstas fueron inoculadas por separado en tubos con medio de cultivo que contiene 5 ml LB y Ap 75 $\mu\text{g/ml}$ para su propagación. Posteriormente los tubos con el medio de cultivo fueron incubados a 37°C con agitación vigorosa durante toda la noche.

5.7.1.1. Aislamiento de DNA de plásmido por Miniprep

Las colonias bacterianas crecidas en 5 ml de medio de cultivo, fueron procesadas por Miniprep Lisis Alcalina para aislar el DNA plásmidico y verificar el tamaño del inserto clonado que contenía cada colonia. En primer lugar, se empastillaron los 5 ml del medio al centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto cada mililitro del medio, hasta llenar un solo tubo de 1.5 ml. Después la pastilla fue resuspendida en 200 μl de solución I fría (Para 100 ml: Glucosa 0.9 g, 2.5 ml Tris pH 8.0 1 M, 2.0 ml EDTA pH 8 0.5 M). Luego se agregó 400 μl de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%). En seguida se agregó 300 μl de solución III (Para 100 ml: 60 ml acetato de potasio 5 M, 11.5 ml ácido acético glacial y 28.5 ml agua milliQ) y se mezcló por inversión. Posteriormente se centrifugó a máxima velocidad durante 5 minutos. Después se transfirió 800 μl del sobrenadante a un tubo nuevo evitando el precipitado blanco. Para precipitar el DNA se agregó 480 μl de isopropanol y se dejó 15 minutos a temperatura ambiente. Para colectar el precipitado de DNA se centrifugó a máxima velocidad durante 5 minutos. Posteriormente el sobrenadante fue eliminado por aspiración con micropipeta. Para eliminar los restos de sales la pastilla fue lavada con 1 ml de etanol al 70%. Después el tubo fue centrifugado nuevamente a máxima velocidad durante 2 minutos. En seguida todo el sobrenadante posible fue eliminado y la pastilla se dejó durante 5 minutos al aire para que se secase. Finalmente la pastilla

fue disuelta en 50 μl de buffer TE (para 100 ml: 1 ml Tris 1 M y 0.2 ml EDTA 0.5 M pH: 8).

5.7.1.2. Análisis de clonas por restricción con la enzima Eco RI

El análisis de las diferentes clonas aisladas para cada canal por restricción se realizó con la enzima Eco RI (NEW ENGLAND *BioLabs*), ya que esta enzima corta en los sitios 52 y 70 liberando el fragmento clonado como se indica en la figura 16. La reacción se realizó al incubar 1 μg de DNA, 1 μl buffer 10X, 1 μl BSA 10X y 0.3 μl de enzima Eco RI 20 u/ μl en un volumen final de 10 μl durante 1 hora a 37°C. El tamaño del fragmento liberado fue verificado por electroforesis a través de gel de agarosa al 0.8%. Los tamaños de los fragmentos obtenidos por restricción fueron verificados por electroforesis en geles de agarosa al 1.2 % como fue descrito en el apartado 5.7.1.3.

5.7.1.3. Electroforesis de fragmentos obtenidos por PCR

Para verificar el tamaño de los fragmentos obtenidos por PCR de cada canal, se realizó una corrida electroforética mezclando 5 μl del producto de la reacción de PCR, 1 μl de buffer muestra 6X (glicerol 30%, azul de bromofenol + xilen cianol). Posteriormente la mezcla fue depositada cuidadosamente en los pozos del gel de agarosa. El marcador de peso molecular empleado fue la escalera de 50 pb de DNA Invitrogen como referencia. La corrida electroforética se realizó colocando el gel que contenía el DNA en buffer de corrida Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X (Tris 40 μM , 1 μM EDTA y BrEt 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$) con EtBr en un campo eléctrico de 120 volts por 30 minutos. La localización del fragmento amplificado fue detectada examinando el gel bajo luz ultravioleta y se fotografió el gel con un equipo de fotodocumentación (Gen Cam).

5.7.2. Secuenciación de los fragmentos de PCR clonados en el plásmido

Los plasmidos analizados por restricción con Eco RI fueron seleccionados de acuerdo al tamaño del fragmento que liberaron ($K_v1= \sim 200$, Maxi-K= ~ 250 y $Ca_v1=$

~350 pb). Una vez seleccionados los posibles plásmidos candidatos por restricción, estos fueron purificados por el Kit *Plus SV Minipreps DNA Purification System* de la marca Promega. Posteriormente los plásmidos purificados fueron procesados independientemente para su secuenciación automática con el Kit Big Dye v 3.1 Applied Biosystems, utilizando 400 ng de DNA del plásmido y 10 μ moles del oligo T7.

5.7.3. Identificación *in silico* de los canales K_v1 secuenciados

Las secuencias obtenidas por secuenciación automatizada fueron comparadas contra la base de datos del Gen Bank en el programa BLAST (blast-nucleótidos) y subsiguientemente en BLAST (blastx-proteínas) para verificar la identidad de cada fragmento clonado (análisis *in silico*). Los programas BLAST blast-nucleótidos y BLAST blastx-proteínas que se encuentran en la página www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi nos permitieron identificar la identidad de las secuencias encontradas con las publicadas de trabajos realizados anteriormente de canales iónicos.

5.8. Cinética de crecimiento de las células RCE1 en presencia del bloqueador de canales de K⁺ TEA

El bloqueo de los canales de K⁺ en el cultivo celular RCE1 fue realizado en células en proliferación con el bloqueador general tetraetilamonio (TEA). Las células RCE1 fueron crecidas sobre una monocapa de células alimentadoras como se describió anteriormente en el apartado 2.2. El bloqueador TEA fue agregado a partir del tercer día, ya que a esta densidad celular de siembra, las células RCE1 se encuentran en proliferación celular hasta que llegan al sexto día a confluencia y empiezan a diferenciarse.

El cultivo celular RCE1 fue crecido en el medio anteriormente descrito con el bloqueador TEA a 0, 2, 10, 25 y 50 mM. Posteriormente se cuantificó el número de células de cada cultivo por conteo de las células cada 24 horas durante 7 días por triplicado. El medio de cada cultivo fue cambiado cada 24 horas con su respectiva

concentración de TEA. El bloqueo de los canales de K^+ en células RCE1 fue realizado en el laboratorio del Dr. Federico Castro-Muñozledo.

6. Resultados

6.1. Identificación de canales de potasio de la familia K_v1 en epitelio corneal

Los canales de potasio activados por voltaje han sido identificados como reguladores de proliferación en varios tipos celulares, particularmente los canales de la familia K_v1 . En el laboratorio estamos interesados en identificar canales de potasio que participen en la regulación de la proliferación y/o de la diferenciación de células de epitelio corneal. Por esa razón en este trabajo inicialmente se identificó la expresión del RNAm de canales de la familia K_v1 en células RCE1.

6.1.1. Amplificación de canales de potasio de la familia K_v1

A partir de células RCE1 de 3 y 8 días en cultivo (Ver figura 18), se realizó la extracción de RNA total, posteriormente se verificó la integridad de éste por medio de un gel desnaturizante de agarosa-formaldehído como se describió en el apartado 5.3.

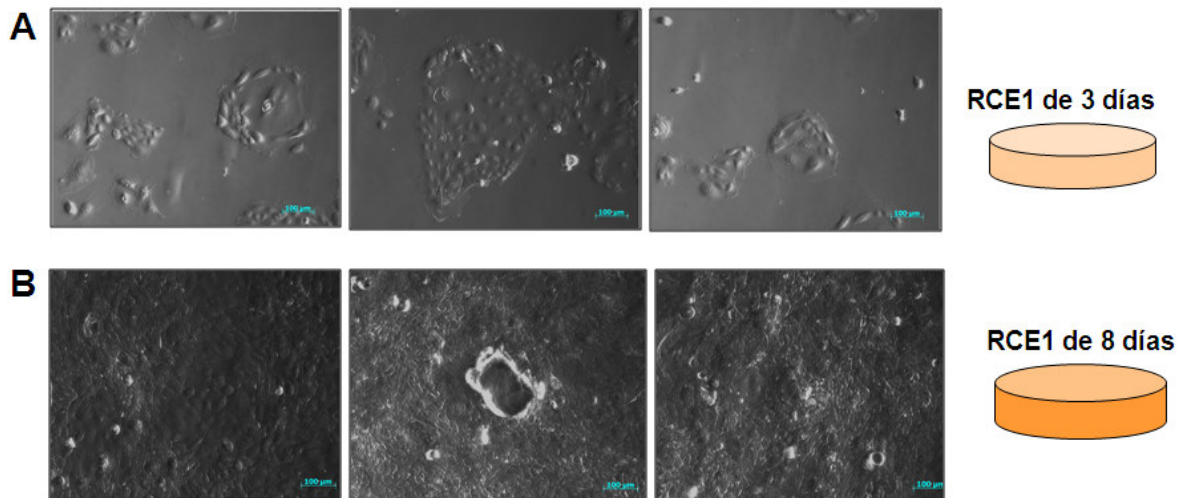


Figura 18. Cultivo de células RCE1. A) Se muestran las células RCE1 de 3 días de cultivo, las cuales se encuentran en proliferación. B) Células RCE1 de 8 días de cultivo, las cuales están en confluencia y diferenciadas.

La banda inferior en el gel de la figura 19 A corresponde al RNAr 18S y la banda superior al del RNAr 28S demostrando la integridad de RNA que se utilizó para la amplificación de los diferentes RNAm. La identificación de diferentes canales de potasio de la familia K_v1 expresados en células RCE1, fue realizada mediante experimentos de RT-PCR, usando los oligonucleótidos KV1F y KV1R dirigidos contra las regiones altamente conservadas de todos los canales de potasio de la familia K_v1 (García-Villegas *et al.*, 2007). En un principio se realizó la síntesis de cDNA a partir del RNA total de células RCE1 crecidas a confluencia (10 días en cultivo), como se describió en materiales y métodos. Posteriormente se realizaron ensayos de PCR utilizando una temperatura de alineamiento (T_a) para los oligonucleótidos de 62°C y 35 ciclos (Figura 19 B) obteniendo un fragmento de 191 pb el cual es más visible en el ensayo de la figura 18 C, en donde la PCR se realizó a 42°C de T_a y se incrementó el número de ciclos a 40. El cambio de T_a en los ensayos de PCR mencionados anteriormente (62 – 42°C) fue realizado para disminuir la especificidad de los oligonucleotidos, y así estos pudieran amplificar a la mayoría de los miembros de los canales de la familia K_v1 . El ensayo de PCR a 42°C de T_a nos permitió amplificar un fragmento mucho más visible que el ensayo de PCR a 62°C de T_a , y a su vez no se amplificaron bandas inespecíficas (Figura 19 B y C).

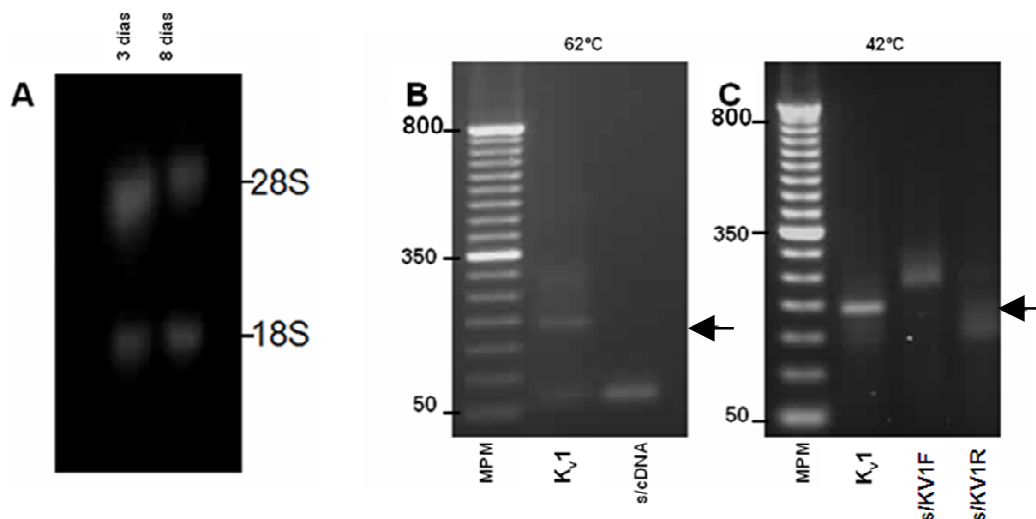


Figura 19. Expresión de canales de K^+ de la familia K_v1 en células RCE1. A) Se muestra la integridad del RNA obtenido de células RCE1 de 3 y 8 días de cultivo. Gel desnaturalizante de agarosa-formaldehído. B) Ensayo de RT-PCR con los oligonucleótidos KV1F-KV1R a 62°C x 35 ciclos. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular (MPM), escalera de 50 pb de DNA Invitrogen. El segundo carril corresponde al amplicón de los canales K_v1 y el tercero al control negativo (sin cDNA). Gel de agarosa al 1.7%. C) Ensayo de PCR a 42°C x 40 ciclos. El carril 1 corresponde al MPM y el carril 2 al amplicón de los canales K_v1 . Los carriles 3 y 4 son controles negativos para determinar la especificidad de los oligonucleótidos empleados, el tercero no contiene el oligonucleótido sentido y el cuarto no contiene el antisentido. Gel de agarosa al 2%. En ambos ensayos (B y C) se obtuvo el fragmento esperado de 191 pb.

Dado que los oligonucleótidos utilizados en la PCR se pueden unir a cualquiera de los diferentes miembros de canales de la familia K_v1 , se procedió a clonar el fragmento amplificado para obtener clonas independientes y secuenciarlas para determinar si correspondían a secuencias de canales de K^+ e identificar si había uno o más canales diferentes en las células RCE1.

6.1.2. Selección de clonas K_v1

El fragmento obtenido por RT-PCR anteriormente descrito, fue clonado en el vector pGEM-T Easy y posteriormente se transformaron bacterias supercompetentes como se describió en el apartado 5.7.1. Una vez transformadas las bacterias, se aislaron clonas independientes que fueron procesadas por lisis alcalina para purificar el DNA plasmídico y posteriormente verificar el tamaño del inserto que contenía cada clona. Se

obtuvieron cuarenta y tres colonias, las cuales fueron analizadas por restricción con la enzima Eco RI, ya que esta corta en los nucleótidos 52 y 70 del vector pGEM-T Easy (Ver mapa, figura 16), liberando el fragmento de PCR clonado. Por consiguiente el producto de cada restricción se corrió en geles de agarosa al 1.2% para seleccionar aquellas clonas que tuvieran tamaños de ~200 pb (Ver figura 20), que es el tamaño aproximado del fragmento de PCR que se clonó. Algunas de las clonas analizadas no contenían fragmento por lo que únicamente se observa el vector de 3015 pb. Sin embargo otras clonas presentaron un fragmento de menor tamaño que el esperado. Finalmente se seleccionaron diez de las cuarenta y tres colonias descritas anteriormente para su posterior secuenciación. Se seleccionaron las clonas 1, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 13, 15 y 16 (Figura 20 A y B).

Para conocer que canales de K⁺ se expresan en las células RCE1, las clonas seleccionadas se purificaron por Minipreps y fueron procesadas por separado para su secuenciación automatizada como se describió en el apartado 5.7.2.

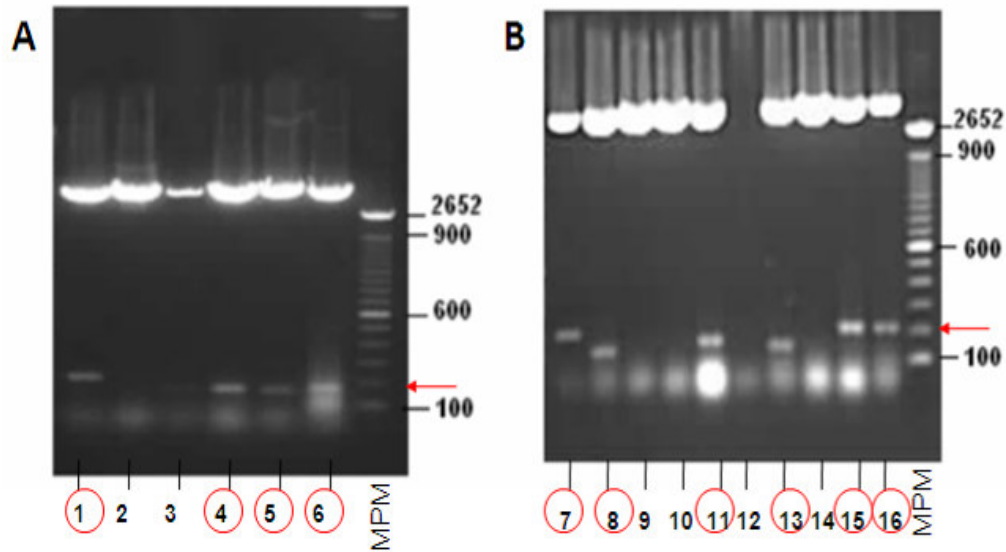


Figura 20. Selección de clonas K_v1 con insertos de ~ 200 pb. A) Se observa el DNA de los posibles candidatos cortados con la enzima Eco RI para liberar el inserto. De izquierda a derecha se muestran las clonas seleccionadas con un círculo rojo. En el carril MPM se muestra la escala de 100 pb de DNA Invitrogen. Geles de agarosa al 1.2%. B) Se observa el resto de las clonas seleccionadas. Se seleccionaron las clonas que contuvieran insertos de ~ 200 pb como se indica con la flecha roja.

6.1.3. Identificación *in silico* de las secuencias clonadas de los canales K_v1

En un inicio las diez secuencias obtenidas a partir de la secuenciación fueron comparadas contra la base de datos del Gen Bank al ser alineadas por separado en el programa BLAST (blast-nucleotidos, www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) determinando el mayor porcentaje de identidad que guarda con las secuencias depositadas en el Gen Bank. De las diez secuencias solo seis se identificaron como canales de K^+ , cuatro correspondieron a la secuencia 1 que tiene la mayor identidad con el canal $K_v1.1$ y las otras dos a las secuencias 2 que tiene mayor identidad con $K_v1.4$ y la secuencia 3 que corresponde al canal $K_v1.5$ aunque su porcentaje de identidad fue menor a 90%. En la figura 21 se muestra el alinamiento de las tres secuencias encontradas como canales de K^+ de la familia K_v1 contra las secuencias que resultaron tener mayor porcentaje de identidad al realizar el análisis *in silico*.

A RNAm de la subunidad alfa del canal de potasio dependiente de voltaje Kv1.1 (*Homo sapiens*). Identidad =185/192 (96%)

```

Secuencia 1 TTTCTTCCTCTTCATCGGGGTCGTCCTGTTTTCTAGCGCAGTGTACTTTGCCGAGGCGGA
Kv1.1 TTT-TTCCTCTTCATCGGGGTCATCCTGTTTTCTAGTGCAGTGTACTTTGCCGAGGCGGA

Secuencia 1 GGAAGCTGAGTCGCACTTCTCCAGTATCCCCGATGCTTTCTGGTGGGCGGTGGTGTCCAT
Kv1.1 AGAAGCTGAGTCGCACTTCTCCAGTATCCCCGATGCTTTCTGGTGGGCGGTGGTGTCCAT

Secuencia 1 GACCACCGTGGGATACGGTGACATGTACCCTGTGACAATTGGAGGCAAGATCGTGGGCTC
Kv1.1 GACCCTGTAGGATACGGTGACATGTACCCTGTGACAATTGGAGGCAAGATCGTGGGCTC

Secuencia 1 CCTGTGTGCCAT
Kv1.1 CTTGTGTGCCAT
  
```

B RNAm de la subunidad alfa del canal de potasio dependiente de voltaje Kv1.4 (*Oryctolagus cuniculus*). Identidad =184/196 (96%)

```

Secuencia 2 TGATTTCTTCTCTTCATCGGGGTCGTCCTCTTTTCCAGCGCTGTGTATTTGCAGAGG
Kv1.4 TGATCTTCTTCTCTTCATTGGGGTCATCCTCTTTTCCAGTGTGTATTTGCAGAGG

Secuencia 2 CGGATGAACCCACTACCCATTTCCAAAGCATTCCAGATGCGTTTTGGTGGGCTGTGGTAA
Kv1.4 CGGATGAACCTACTACCCATTTCCAAAGCATTCCAGATGCAATTTGGTGGGCTGTGGTAA

Secuencia 2 CCATGACAACCTGTGGGCTATGGGGACATGAAGCCCATCACAGTCGGGGGAAAGATCGTGG
Kv1.4 CCATGACAACCTGTGGGCTATGGGGACATGAAGCCCATCACCGTGGGGGGAAGATCGTGG

Secuencia 2 GCTCCCTGTGTGCCAT
Kv1.4 GGTCCCTGTGTGCCAT
  
```

C RNAm de la subunidad alfa del canal de potasio dependiente de voltaje Kv1.5 (*Oryctolagus cuniculus*). Identidad =168/188 (89%)

```

Secuencia 3 TTCTTCCTCTTCATCGGGGTCGTCCTCTTCTCCAGCGCCGTCTACTTCGCAGAGGCTGAT
Kv1.6 TTCTTCCTCTTCATCGGAGTCATCCTCTTCTCCAGCGCCGTCTACTTCGCAGAGGCTGAC

Secuencia 3 GA-C-GATGACTCACTTTTCCCAGCATCCCCGACGCTTCTGGTGGGCGGTGGTACCA
Kv1.6 AACGAGGGGACCCAC--TTCTCCAGCATCCCCGATGCCTTCTGGTGGGCGGTGGTACCA

Secuencia 3 TGACCACGGTGGGCTACGGGGACATGTAC-CCCATGACGGTGGGGGCAAGATCGTGGGC
Kv1.6 TGACCACGGTGGGCTACGGGGACATG-AGGCCCATCACAGTGGGGGCAAGATCGTGGGC

Secuencia 3 TCCCTGTG
Kv1.6 TCCCTGTG
  
```

Figura 21. Alineamiento de las secuencias 1, 2 y 3 contra las secuencias que resultaron tener el mayor porcentaje de identidad en el Gen Bank. A) Secuencia 1 VS secuencia del canal Kv1.1 de *Homo sapiens*. B) Secuencia 2 VS secuencia del canal Kv1.4 de *Oryctolagus cuniculus* (conejo). C) Secuencia 3 VS secuencia del canal Kv1.5 de *Oryctolagus cuniculus*.

La secuencia 1 tuvo 96% de identidad con el RNAm del canal $K_v1.1$ de la especie *Homo sapiens*. La secuencia 2 también alcanzó 96% de identidad pero con el canal $K_v1.4$ de *Oryctolagus cuniculus*. Cuando se realizó el análisis *in silico* de la secuencia 3, se halló que esta secuencia tiene 89% de identidad con el canal $K_v1.5$ de *Oryctolagus cuniculus*. Al no encontrar un porcentaje de identidad del 100% en *Oryctolagus cuniculus* (especie del cual derivan las células RCE1), se analizaron los electroferogramas de las tres secuencias (1, 2 y 3) que resultaron tener identidad con canales de K^+ de la familia K_v1 mencionadas anteriormente para verificar si existían errores en la lectura de las secuencias por el secuenciador automatizado. En la figura 22 se muestra el electroferograma de la secuencia 1 ($K_v1.1$) que está delimitada por los oligonucleótidos KV1F-KV1R. En la figura 23 se muestra el electroferograma de la secuencia 2, mientras en la figura 24 se muestra el de la secuencia 3. Esta última figura muestra que los oligonucleótidos (KV1F-KV1R) están invertidos, por lo que la secuencia 3 fue clonada en el vector pGEM-T Easy de manera invertida con respecto a las otras 2 secuencias. La secuencia que se encuentra antes de los oligonucleótidos (KV1F-KV1R) en cada electroferograma corresponde a un fragmento del vector de clonación pGEM-T Easy. El análisis de los electroferogramas de las figuras 22, 23 y 24 consistió en revisar si cada una de las bases de las secuencias 1, 2 y 3 concordaban con los picos emitidos en cada electroferograma, además se verificó si alguno de estos picos no estaban solapados entre sí. Posteriormente se volvieron a secuenciar las clonas de las secuencias 1, 2 y 3 para confirmar la identidad de cada una de estas.

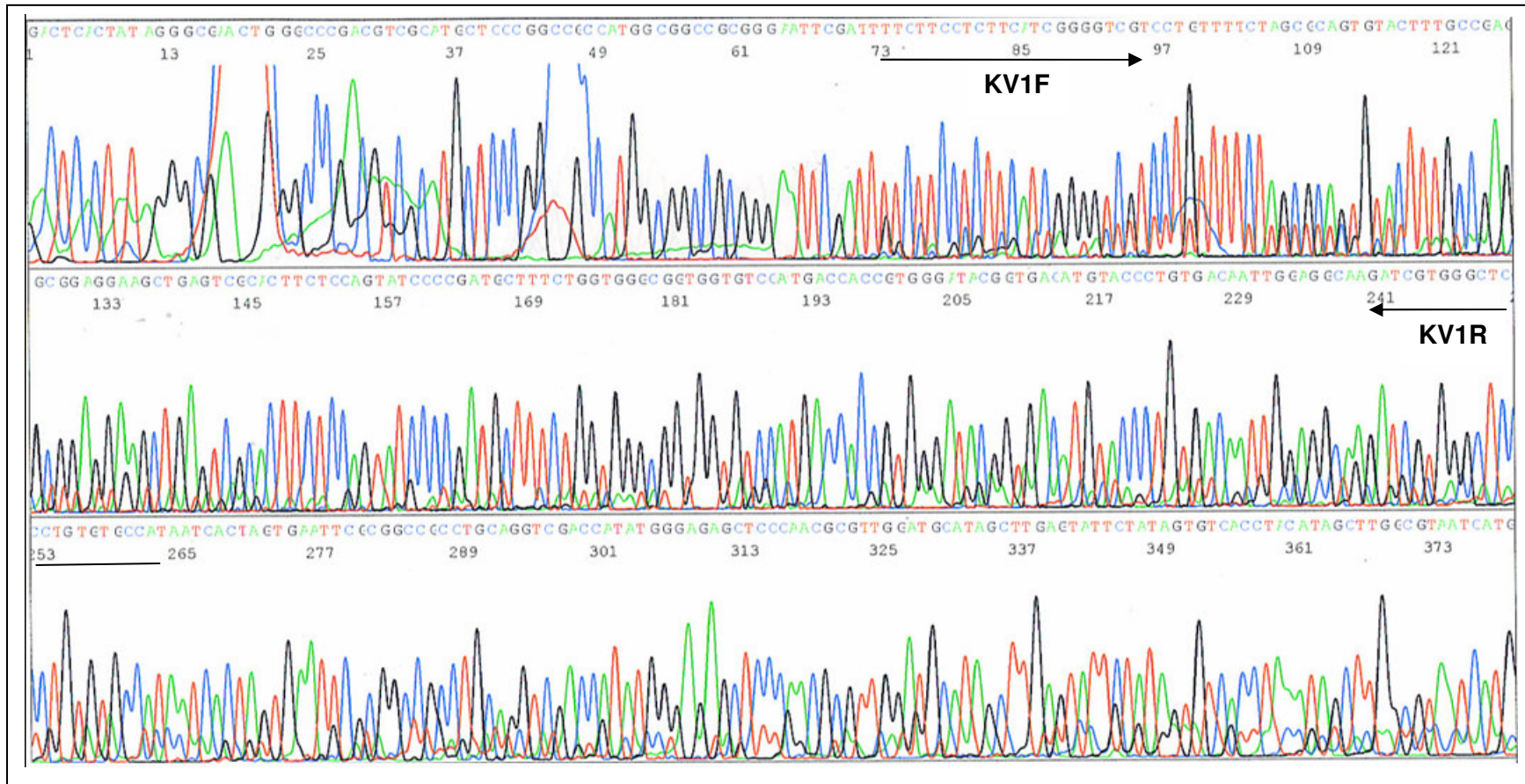


Figura 22. Secuencia 1 expresada en las células RCE1, registrada por el secuenciador ABIPRISM Modelo 3100.

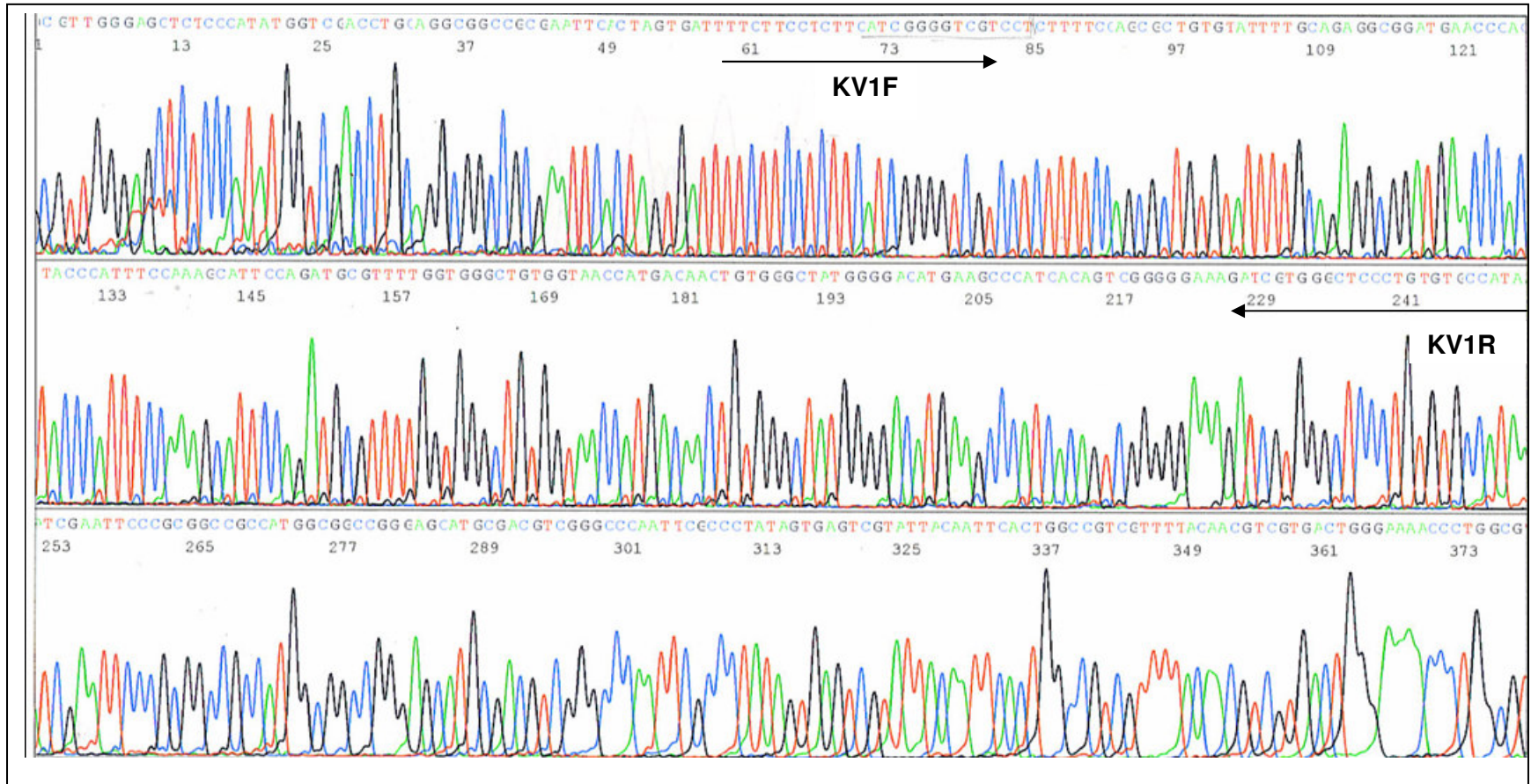


Figura 23. Secuencia 2 expresada en las células RCE1, registrada por el secuenciador ABIPRISM Modelo 3100.

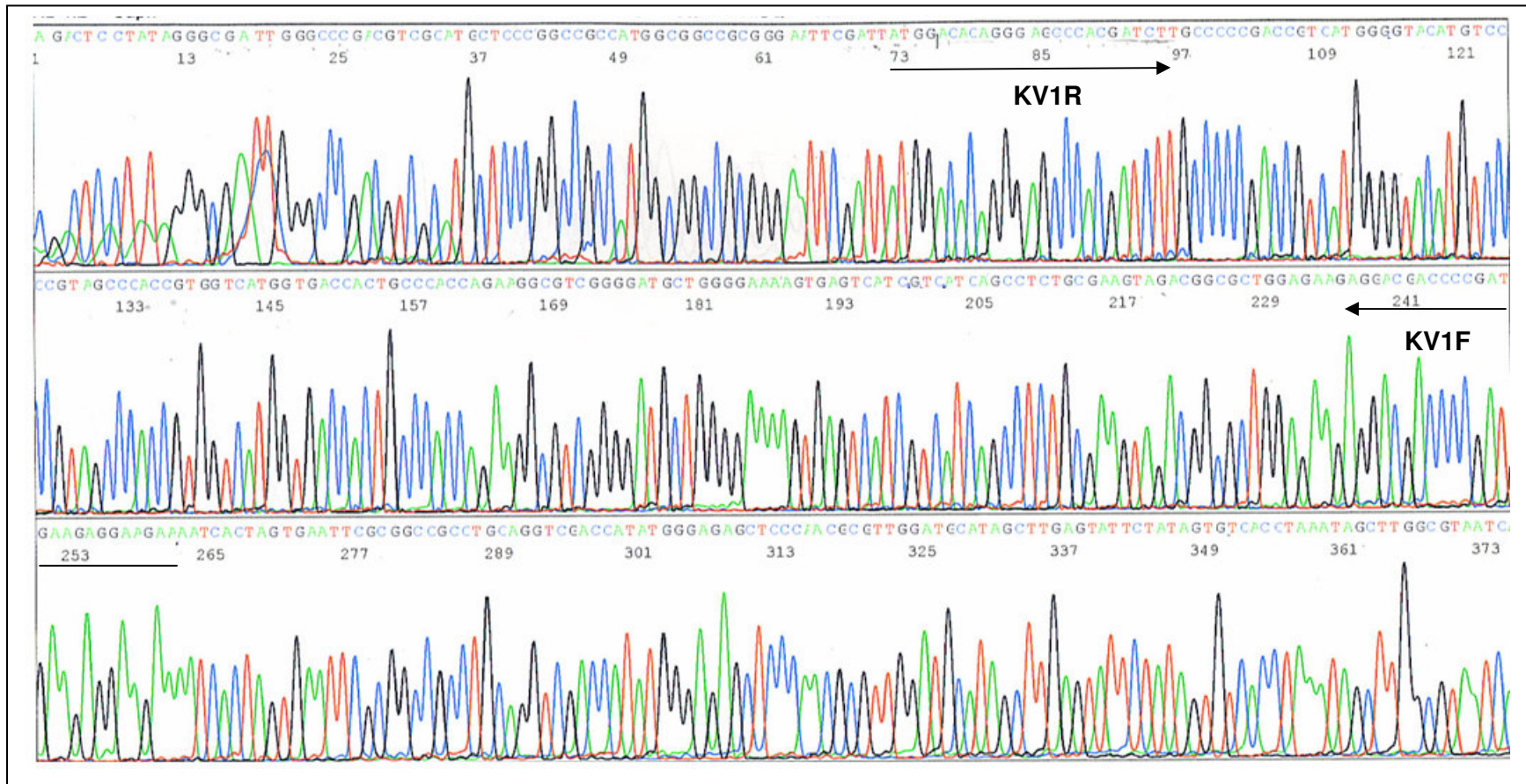


Figura 24. Secuencia 3 expresada en las células RCE1, registrada por el secuenciador ABIPRISM Modelo 3100.

Al no encontrar ningún error en la lectura de las secuencias (1, 2 y 3) con relación al espectro de emisión de cada base en los electroferogramas y debido a que la secuenciación se realizó por duplicado, se decidió realizar una segunda búsqueda mucho más exhaustiva en el Gen Bank para comparar el porcentaje de identidad con otras especies y determinar con mayor precisión el tipo de canal al que pertenece cada una de las secuencias encontradas en las células RCE1. En primer lugar se investigó si cada una de estas secuencias reportadas como canales de K⁺ de la familia K_V1 tenían un alto porcentaje de identidad con las especies: *Homo sapiens* (humano), *Mus musculus* (ratón), *Rattus norvegicus* (rata) y *Oryctolagus cuniculus* (conejo) realizando nuevamente un alineamiento en el programa BLAST (blast-nucleótidos) contra las secuencias reportadas en el Gen Bank. La especie *Homo sapiens* se eligió para este análisis, ya que su genoma está totalmente secuenciado y esto nos permite determinar si las secuencias encontradas (1, 2 y 3) tienen alguna identidad con diferentes canales de la familia K_V1. Por otro lado las especies: *Mus musculus* y *Rattus norvegicus* fueron elegidas por la alta homología que guarda su genoma con el de *Oryctolagus cuniculus* que aún no está totalmente secuenciado. Al comparar las secuencias (1, 2 y 3) con *Mus musculus* y *Rattus norvegicus* nos permitió tener una mayor idea de qué canales de la familia K_V1 podrían estar expresándose en RCE1. Las tabla 2, 3 y 4 muestran el segundo análisis realizado para la identificación *in silico* en el programa BLAST básico (blast nucleótidos) de las secuencias 1, 2 y 3. La primera columna en las tablas 2, 3 y 4 muestra la identidad que tiene cada una de las secuencias encontradas con respecto a los canales K_V1 reportados en el GenBank. Los primeros números que se hallan al principio de estas columnas, representan la razón por la cual se obtuvo el porcentaje de identidad, es decir el número de nucleótidos conservados dividido entre el número total de nucleótidos de la región con homología comparada, el cociente de estos dos números multiplicado por cien, proporciona el porcentaje de identidad, el cual está entre parentesis. La segunda columna

corresponde al tipo de canal que identificó el programa como la secuencia del Gen Bank de mayor homología con la secuencia que se introdujo al análisis. En la tercera columna se hallan las cuatro especies que fueron elegidas para el análisis *in silico*, y en la última columna se encuentra el número de acceso en el Gen Bank de las secuencias de canales de la familia K_V1 que fueron alineadas con las secuencias problema. El segundo análisis *in silico* indicó que la secuencia 1 es el canal K_V1.1, ya que la identidad que mostró con el canal K_V1.1 de las especies: *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* y *Oryctolagus cuniculus* fue de 95 - 97% (tabla 2), y la secuencia 2 mostró ser de nuevo el canal K_V1.4 con 92 - 98% de identidad en las distintas especies (tabla 3). Sin embargo, nuevamente no fue posible determinar la identidad molecular de la secuencia 3 debido al bajo porcentaje de identidad obtenido en su análisis (tabla 4). La secuencia 3 mostró tener 89 y 90% de identidad con el canal K_V1.5 de las especies *Oryctolagus cuniculus* y *Homo sapiens*, mientras que con las especies *Mus musculus* y *Rattus norvegicus* obtuvo 82% de identidad con el canal K_V1.7 (tabla 4).

Tabla 2. Identificación *in silico* de la secuencia 1 (Programa BLAST blast- nucleotidos).

IDENTIDAD (sec. 1)	TIPO DE CANAL	ESPECIE	Nº ACCESO
182/188 (96%)	K _V 1.1	<i>Homo sapiens</i>	NM_000217.2
181/188 (96%)	K _V 1.1	<i>Mus musculus</i>	NM_010595.3
179/188 (95%)	K _V 1.1	<i>Rattus norvegicus</i>	NM_173095.3
82/84 (97%) parcial	K _V 1.1	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	M81350.1

Tabla 3. Identificación *in silico* de la secuencia 2 (Programa BLAST blast- nucleotidos).

IDENTIDAD (sec. 2)	TIPO DE CANAL	ESPECIE	Nº ACCESO
178/192 (92%)	K _V 1.4	<i>Homo sapiens</i>	NM_002233.2
185/188 (98%)	K _V 1.4	<i>Mus musculus</i>	U03723.1
180/189 (95%)	K _V 1.4	<i>Rattus norvegicus</i>	NM_012971.2
180/191 (94%)	K _V 1.4	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	AF493544.1

Tabla 4. Identificación *in silico* de la secuencia 3 (Programa BLAST blast- nucleotidos).

IDENTIDAD (sec. 3)	TIPO DE CANAL	ESPECIE	Nº ACCESO
171/194 (90%)	K _v 1.5	<i>Homo sapiens</i>	NM_002234.2
162/197 (82%)	K _v 1.7	<i>Mus musculus</i>	NW_047558.2
163/198 (82%)	K _v 1.7	<i>Rattus norvegicus</i>	NT_039424.7
168/188 (89%)	K _v 1.5	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	NM_001082036.1

Con los porcentajes obtenidos en el análisis *in silico* de la secuencia 3 no fue posible determinar su identidad, por lo que fue necesario realizar un tercer análisis *in silico*. Este consistió en traducir las secuencias 1, 2 y principalmente la 3 en aminoácidos y realizar un alineamiento contra las secuencias de proteínas de las especies: *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* y *Oryctolagus cuniculus* depositadas en la base de datos del Protein Bank. En el análisis se utilizó el programa BLAST (blastx-proteínas, www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), debido a que es una herramienta que al introducir secuencias de nucleótidos, automáticamente las traduce en secuencias de aminoácidos. Una vez traducidas las secuencias de nucleótidos-aminoácidos, el mismo programa alinea las secuencias no conocidas contra las secuencias del Protein Bank. Este tercer análisis *in silico* fue realizado con la idea de identificar a la secuencia 3 y posiblemente obtener mayor porcentaje de identidad con respecto a las secuencias de aminoácidos de otras proteínas que pertenecen a la familia de canales K_v1, además también fue realizado para obtener porcentajes de similitud en las secuencias 1, 2 y 3, y así determinar la identidad correcta de cada secuencia.

En las tablas 5, 6 y 7 se muestra el tercer análisis *in silico* realizado para la identificación de las secuencias 1, 2 y 3. En la primera columna de las tablas 5, 6 y 7 se muestra el porcentaje de similitud de las secuencias 1, 2 y 3 traducidas en aminoácidos con respecto a las proteínas de canales de la familia K_v1 reportadas en el Protein Bank. Las columnas siguientes contienen la misma información que se explicó anteriormente en las tablas 2, 3 y 4 (% IDENTIDAD, TIPO DE CANAL, ESPECIE, Nº ACCESO). En la tabla

5 se muestra el análisis realizado para la secuencia 1, en donde se obtuvo 100% de similitud y 98/96% de identidad con el canal K_v1.1 de *Homo sapiens* y *Mus musculus*. Sin embargo no se encontró similitud ni identidad en *Rattus norvegicus* y *Oryctolagus cuniculus* esto probablemente se debe a que la proteína del canal K_v1.1 no se ha incluido en el banco de proteínas. En la tabla 6 se muestran el análisis realizado para la secuencia 2, en donde se obtuvo 100% de similitud y 98% de identidad con el canal K_v1.4 en las especies: *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* y *Oryctolagus cuniculus*. En la tabla 7 se muestra el análisis de la secuencia 3, en donde se obtuvo 100% de similitud con el canal K_v1.6 en todas las especies excepto *Oryctolagus cuniculus*. Su identidad resultante fue de 98% en *Homo sapiens* y 96% en *Mus musculus* y *Rattus norvegicus*.

Tabla 5. Identificación *in silico* de la secuencia 1 (Programa BLAST blastx- proteínas).

SIMILITUD	IDENTIDAD (sec. 1)	TIPO DE CANAL	ESPECIE	Nº ACCESO
100%	62/63 (98%)	K _v 1.1	<i>Homo sapiens</i>	NM_000217.2
100%	62/63 (96%)	K _v 1.1	<i>Mus musculus</i>	NM_010595.3
-	-	-	<i>Rattus norvegicus</i>	-
-	-	-	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	-

Tabla 6. Identificación *in silico* de la secuencia 2 (Programa BLAST blastx- proteínas).

SIMILITUD	IDENTIDAD (sec. 2)	TIPO DE CANAL	ESPECIE	Nº ACCESO
100%	62/63 (98%)	K _v 1.4	<i>Homo sapiens</i>	AAA61275.1
100%	62/63 (98%)	K _v 1.4	<i>Mus musculus</i>	Q61423
100%	62/63 (98%)	K _v 1.4	<i>Rattus norvegicus</i>	NP_037103.1
100%	62/63 (98%)	K _v 1.4	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	M81350.1

Tabla 7. Identificación *in silico* de la secuencia 3 (Programa BLAST blastx- proteínas).

SIMILITUD	IDENTIDAD (sec. 3)	TIPO DE CANAL	ESPECIE	Nº ACCESO
100%	61/62 (98%)	K _V 1.6	<i>Homo sapiens</i>	EAW88834.1
100%	60/62 (96%)	K _V 1.6	<i>Mus musculus</i>	NP_038596.1
100%	60/62 (96%)	K _V 1.6	<i>Rattus norvegicus</i>	XP_575671.1
-	-	-	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	-

A consecuencia de este último análisis y los anteriores, se determinó que las secuencias 1 y 2 son los canales K_V1.1 y -1.4, mientras que la secuencias 3 corresponde al canal K_V1.6. Finalmente el tercer análisis *in silico* (blastx-proteínas), junto con el primero y el segundo (blast-nucleotidos), nos permitió determinar qué tipo de canales de la familia K_V1 están presentes en las células RCE1.

Dado que la identificación de los canales de potasio de la familia K_V1 fue realizada mediante experimentos de RT-PCR, usando los oligonucleótidos KV1F y KV1R dirigidos contra las regiones altamente conservadas de todos los canales de potasio de la familia K_V1, fue necesario alinear las secuencias: K_V1.1, -1.4 y -1.6 para distinguir las regiones con menor identidad y así poder diseñar tres oligonucleótidos específicos que amplifiquen a cada secuencia por separado para los posteriores ensayos de PCR.

6.1.4. Alineamiento de los canales K_V1 identificados

En las células RCE1 se detectó la expresión de tres canales iónicos de la familia K_V1: K_V1.1, -1.4 y -1.6, cabe mencionar que esta es la primera vez que se encuentra la expresión de estos tres canales en las células RCE1 de conejo. El alineamiento de K_V1.1, -1.4 y -1.6 fue realizado con las 191 pb de cada secuencia amplificada usando el programa (NTI Vector V7.0). En la figura 25 se muestra el alineamiento de los tres canales indicando las diferencias que existen entre cada una de las secuencias. Para el diseño de oligonucleótidos específicos para K_V1.1, -1.4 y -1.6 se tomó en cuenta las

diferencias entre cada secuencia. Los oligonucleótidos específicos se muestran con las flechas delgadas en cada secuencia (Figura 25).

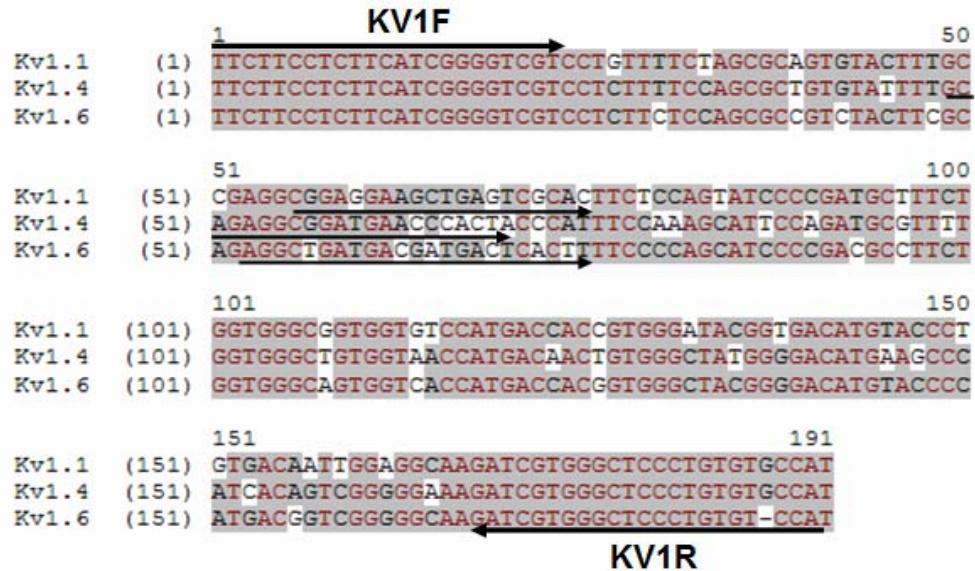


Figura 25. Alineamiento de los canales secuenciados Kv1.1, -1.4 y -1.6 amplificados con los oligonucleótidos KV1F y KV1R. A pesar de presentar una alta identidad entre cada una de las secuencias, existen diferencias suficientes para amplificar a cada canal por separado utilizando los oligonucleótidos sentido subrayados en cada secuencia y el oligonucleótido antisentido KV1R.

Una vez diseñados los oligonucleótidos específicos para cada secuencia, se realizaron ensayos de RT-PCR con RNA de células RCE1 de 8 días de cultivo y con RNA de epitelio corneal para probar la especificidad de los oligonucleótidos y determinar la expresión de los canales Kv1.1, -1.4 y -1.6 tanto en la línea celular RCE1 como en el tejido original de epitelio corneal.

6.1.5. Expresión de canales Kv1 en células RCE1 y en epitelio corneal

La expresión de los canales Kv1.1, -1.4 y -1.6 en RCE1 de 8 días y en epitelio corneal de conejo (ECC) fue demostrada por medio de PCR con los oligonucleótidos específicos. En la figura 26 se muestra la amplificación de cada canal por separado en

células RCE1 de 8 días de cultivo y ECC, demostrando su expresión tanto en la línea celular (Figura 26 A) como en el tejido original (Figura 26 B).

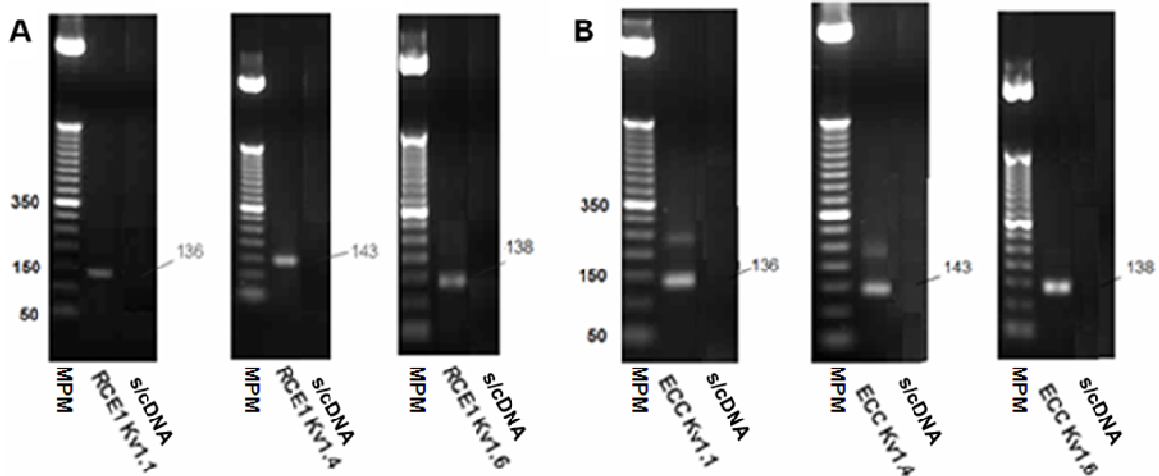


Figura 26. Expresión de los canales $K_v1.1$, -1.4 y -1.6 en RCE1 de 8 días y ECC. La amplificación en RCE1 y ECC fue realizada por PCR a 60°C x 35 ciclos con los oligonucleótidos específicos. A) Amplificación en células RCE1 de 8 días de cultivo. B) Amplificación en ECC. En el primer carril de cada ensayo de PCR de la imagen A y B, se muestra el marcador de peso molecular (MPM), escalera de 50pb de DNA Invitrogen. El segundo carril corresponde al amplicon de cada canal en RCE1 (A) y ECC (B). El tercero es el control negativo (s/cDNA). Geles de agarosa al 2%. Los tamaños de los fragmentos esperados se indican con una línea.

El tamaño esperado en la amplificación de los canales K_v1 fue: $K_v1.1= 136$ pb, $K_v1.4= 143$ pb y $K_v1.6= 138$ pb. Los tamaños de las secuencias amplificadas son muy proximos entre si, por lo que es difícil determinar con precisión el tamaño correspondiente para dicha secuencia en cada gel. Sin embargo para discernir si los oligonucleótidos específicos amplifican a cada canal por separado, se analizaron las secuencias alineadas de la figura 25, a partir de los oligonucleótidos específicos marcados con una flecha; hasta el oligonucleótido antisentido (KV1R) en el programa NEBcutter V2.0 (www.tools.neb.com/NEBcutter2/index.php) y se investigó qué enzima corta únicamente a cada canal por separado. Para determinar que enzimas de restricción utilizar en el corte de cada secuencia ($K_v1.1$, -1.4 y -1.6), se examinó qué enzimas cortan a la secuencia $K_v1.1$ pero no a $K_v1.4$ ni a $K_v1.6$. Para $K_v1.4$ de la misma manera se eligió una enzima

que corte esta secuencia pero no a $K_V1.6$ ni a $K_V1.1$, y lo mismo fue realizado con $K_V1.6$. Por otra parte también se tomó en cuenta el tamaño del fragmento que generaría cada restricción con cierta enzima, ya que fragmentos menores a 50 pb difícilmente son visibles en el gel de agarosa. Por lo tanto, las enzimas que se eligieron fueron aquellas que cortaban únicamente a cada secuencia por separado y que generan fragmentos mayores a 50 pb. En la figura 27 se muestra los sitios de restricción de $K_V1.1$, $K_V1.4$ y $K_V1.6$. Las enzimas de restricción utilizadas para cortar a cada una de las secuencias fueron: para $K_V1.1$ MfeI: que produce dos fragmentos de 100 y 36 pb, para $K_V1.4$ BsmI: que produce los fragmentos 108 y 35 pb y para $K_V1.6$ HgaI: produciendo 90 y 48 pb.



Figura 27. Análisis de los sitios de restricción de los canales $K_V1.1$, -1.4 y -1.6, y las enzimas que los cortan. El análisis fue realizado con el programa NEB Cutter (NEW ENGLAND Bio Labs). A) Secuencia del canal $K_V1.1$. B) Secuencia del canal $K_V1.4$. C) Secuencia del canal $K_V1.6$. Las enzimas empleadas en el corte de cada secuencia están señaladas con un ovalo rojo.

Para realizar la restricción de las secuencias $K_V1.1$, -1.4 y -1.6, inicialmente se amplificó el cDNA de las células RCE1 de 8 días por medio de PCR con los oligonucleótidos

específicos de cada secuencia. Posteriormente con el producto de cada PCR realizada por separado, se realizó la restricción de cada una de las secuencias. En la figura 28 se muestra la amplificación de los canales: K_V1.1, -1.4 y -1.6 y el análisis de restricción realizado para cada secuencia. En los carriles K_V1.1 + MfeI, K_V1.4 + BsmI y K_V1.6 + HgaI se muestran las restricciones de cada secuencia con su respectiva enzima. La enzima MfeI cortó a la secuencia K_V1.1 generando fragmentos de 100 + 36 pb. La enzima BsmI cortó a la secuencia K_V1.4 generando fragmentos de 108 + 35 pb y la enzima HgaI cortó a la secuencia K_V1.6 generando fragmentos de 90 + 48 pb. En los carriles K_V1.1, -1.4 y -1.6 se muestran las amplificaciones de cada una de estas secuencias sin realizar la restricción. Evidentemente las enzimas empleadas que cortan a cada fragmento por separado, demostraron la especificidad de los oligonucleótidos para amplificar las secuencias: K_V1.1, -1.4 y -1.6 por separado.

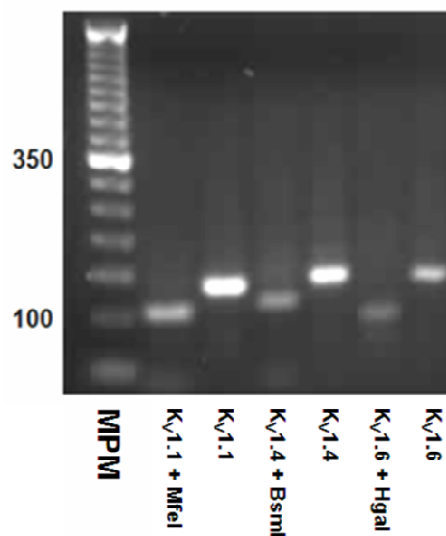


Figura 28. Amplificación específica y análisis de restricción de los canales K_V1.1, -1.4 y -1.6. Ensayo de PCR con oligonucleótidos específicos a 60°C x 35 ciclos. El primer carril corresponde al MPM, escalera de 50 pb de DNA Invitrogen. Gel de agarosa al 2%. En cada carril se indica el fragmento de PCR analizado y la enzima utilizada para su restricción.

6.2. Identificación del canal de potasio Maxi-K en epitelio corneal

Además de los canales de K^+ de la familia K_v1 , los canales de K^+ dependientes de calcio (K_{Ca}) también han sido relacionados como reguladores de la proliferación en varios tipos de celulares. Por esa razón en el presente trabajo también nos interesamos en identificar el canal Maxi-K y determinar si participa en la regulación de la proliferación de células de epitelio corneal. Por lo que de igual manera inicialmente se identificó la expresión de RNAm del canal Maxi-K en RCE1.

6.2.1. Amplificación del RNAm del canal de potasio Maxi-K

La identificación del canal Maxi-K expresado en células RCE1 de 3 y 8 días fue realizado mediante experimentos de RT-PCR usando los oligonucleótidos DsloF y DsloR que reconocen una región que no presenta variaciones de procesamiento alternativo equivalente al que usaron para detectar Maxi-K en las células MDCK en trabajos previos en el laboratorio (García-Villegas *et al.*, 2007). En primer lugar se realizó la síntesis de cDNA a partir de RNA total de células RCE1 de 3 y 8 días de cultivo como se describió en materiales y métodos. Posteriormente se realizaron ensayos de PCR a 60°C de T_a y 35 ciclos, amplificando un fragmento de 255 pb (Figura 29 A - B). Posteriormente se clonó el fragmento amplificado de 255 pb para obtener clonas independientes y secuenciarlas para determinar si correspondieron a la secuencia del canal Maxi-K reportado en el Gen Bank (No. acc. AF201702).

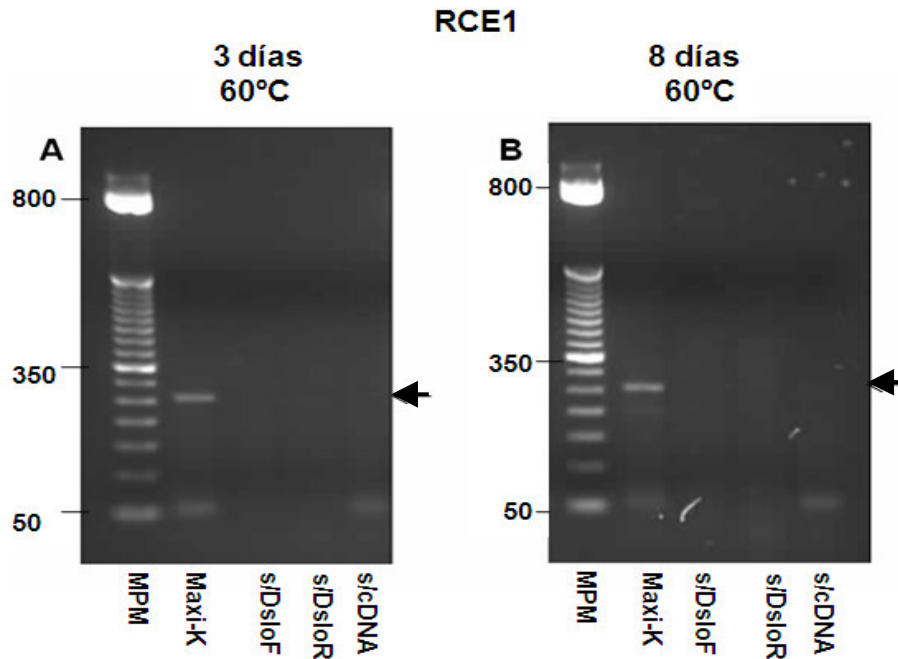


Figura 29. Expresión del canal Maxi-K en células RCE1. Ensayos de RT-PCR con los oligonucleótidos DsloF-DsloR a 60°C de Ta x 35 ciclos. Geles de agarosa al 2%. A) Amplicón en células RCE1 de 3 días. En el primer carril se muestra el MPM, escalera de 50 pb de DNA Invitrogen. El segundo carril corresponde al amplicón del canal Maxi-K. El tercer, cuarto y quinto carril son controles negativos, el tercero no contiene el oligonucleótido sentido DsloF (sentido), el cuarto no contiene el antisentido DsloR y el quinto no contiene cDNA. B) Amplicón en células RCE1 de 8 días. En ambos ensayos (A-B) se amplificó el fragmento esperado de 255 pb.

6.2.2. Selección de clonas Maxi-K

El fragmento Maxi-K amplificado por RT-PCR fue clonado de la misma forma como se describió para los canales de K⁺ de la familia K_v1 anteriormente descritos. Se obtuvieron quince clonas, las cuales fueron también analizadas por restricción con la enzima Eco RI. El producto de cada restricción se corrió en un gel de agarosa al 1.2% y solo se escogió una clona de las quince para su posterior secuenciación, ya que esta presentó el tamaño esperado de ~250 pb (Figura 30).

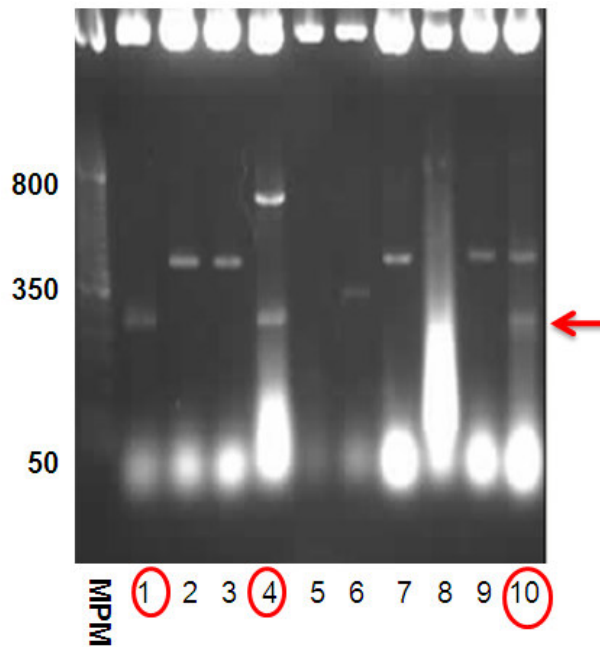


Figura 30. Selección de clonas Maxi-K con insertos de ~250 pb. Se observa el DNA de los posibles candidatos cortados con la enzima Eco RI. De izquierda a derecha se muestran las clonas seleccionadas con un círculo rojo. En el primer carril MPM se muestra la escalera de 50 pb de DNA invitrogen. Gel de agarosa al 1.2%. La selección de clonas se basó en aquellas que contuvieran insertos de ~250 pb como se indica con la flecha roja.

Para determinar si el canal Maxi-K se expresa en las células RCE1, la clona 1 se purificó por Minipreps y fue procesada para su secuenciación automatizada como fue descrito para los canales de K^+ de la familia K_v1 en el apartado 5.7.2. En la figura 31 se muestra el electroferograma de la secuencia 4 que está delimitada por los oligonucleótidos DsloF-DsloR. El electroferograma de la secuencia 4 también fue revisado de la misma manera como se realizó con los canales K_v1 , antes de realizar el análisis *in silico* para evitar obtener alguna secuencia errónea. Al no encontrar errores de lectura por el secuenciador automatizado se procedió a determinar la identidad de la secuencia 4 por medio de análisis *in silico*.

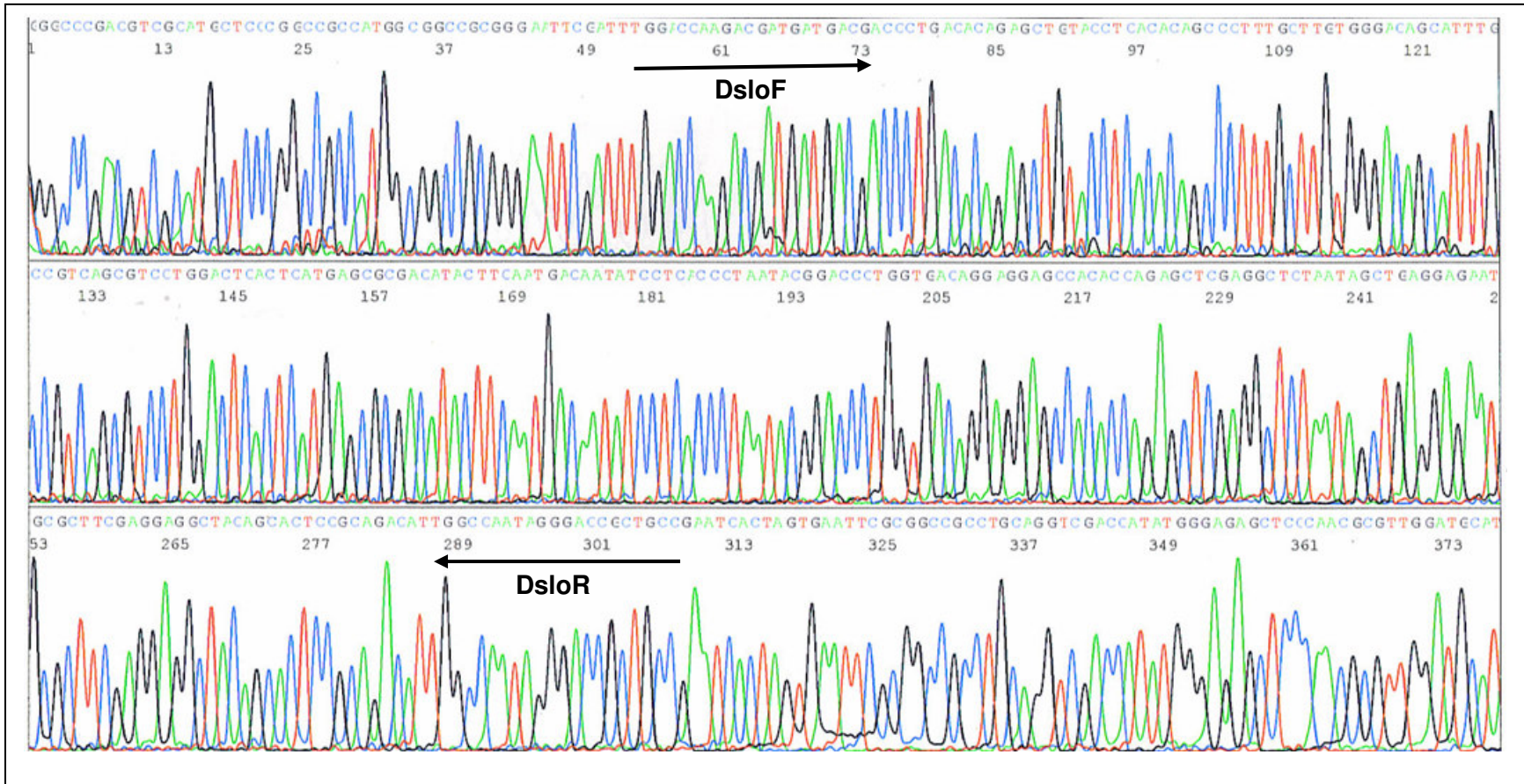


Figura 31. Secuencia 4 expresada en las células RCE1, registrada por el secuenciador ABIPRISM Modelo 3100.

6.2.3. Identificación *in silico* de la secuencia 4 (Maxi-K)

La secuencia 4 que fue obtenida a partir de la secuenciación fue comparada contra la base de datos del Gen Bank al ser alineada en el programa BLAST (blast-nucleótidos) determinando el mayor porcentaje de identidad con las secuencias de canales depositadas en el Gen Bank de las especies: *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* y *Oryctolagus cuniculus*. En la tabla 8 se muestra el análisis *in silico* realizado en el programa BLAST (blast-nucleótidos). Este análisis indicó que la secuencia 4 es el canal Maxi-K, ya que la identidad que mostró frente al canal Maxi-K de las especies: *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* y *Oryctolagus cuniculus* fue de 90 – 98% (tabla 8). En *Homo sapiens* no hubo secuencia alguna que tuviera identidad con la secuencia 4.

Tabla 8. Identificación *in silico* de la secuencia 4 (Programa BLAST blastx- proteínas).

IDENTIDAD (sec. 3)	TIPO DE CANAL	ESPECIE	Nº ACCESO
-	-	<i>Homo sapiens</i>	-
250/255 (98%)	Maxi-K	<i>Mus musculus</i>	BC128331.1
244/255 (95%)	Maxi-K	<i>Rattus norvegicus</i>	U93052.1
231/255 (90%)	Maxi-K	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	AF201702

Al realizar el análisis *in silico* de la secuencia del canal Maxi-K de RCE1 (MaxiK-RCE1) se obtuvo 90% de identidad con el canal Maxi-K de *Oryctolagus cuniculus* reportado en el Gen Bank (MaxiK-GenBank), sin embargo al realizar un análisis *in silico* con MaxiK-RCE1 en el programa BLAST (blastx-proteínas) se obtiene 100% de similitud en distintas especies (**resultados no mostrados**) lo que confirmó su identidad.

Debido a que la secuencia del canal Maxi-K de las células RCE1 (MaxiK-RCE1) en teoría debería ser idéntica a la secuencia del canal Maxi-K depositada en el Gen Bank (MaxiK-GenBank), se decidió analizar las diferencias que existen entre cada secuencia mediante un alineamiento.

6.2.4. Alineamiento de MaxiK-RCE1

En las células RCE1 de 3 y 8 días por primera vez se detectó la expresión del canal Maxi-K. En la figura 32 se muestra el alineamiento del canal MaxiK-RCE1 VS MaxiK-GenBank, el cual fue realizado en el programa NTI Vector V7.0.

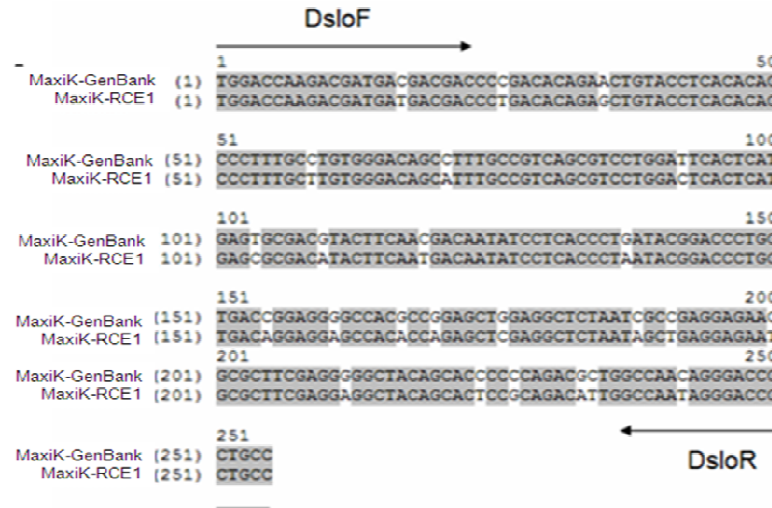


Figura 32. Alineamiento de MaxiK-RCE1 VS MaxiK-GenBank de conejo. La primera secuencia corresponde a MaxiK-GenBank. La segunda a la secuencia MaxiK-RCE1.

Se encontraron 23 diferencias en el fragmento de 255 pb de la secuencia MaxiK-RCE1 con respecto a la secuencia de Maxi-K reportada en el Gen Bank, tanta discrepancia se podría deber a que tal vez podrían haber errores en la secuencia reportada como Maxi-K en el Gen Bank.

Finalmente para determinar la especificidad de los oligonucleótidos DsloF-DsloR se analizó la secuencia MaxiK-RCE1 en el programa NEBcutter V2.0 y se eligió la enzima Aval, ya que esta enzima genera fragmentos de 174 + 82 pb en el fragmento de PCR amplificado en MaxiK-RCE1 (Figura 33).

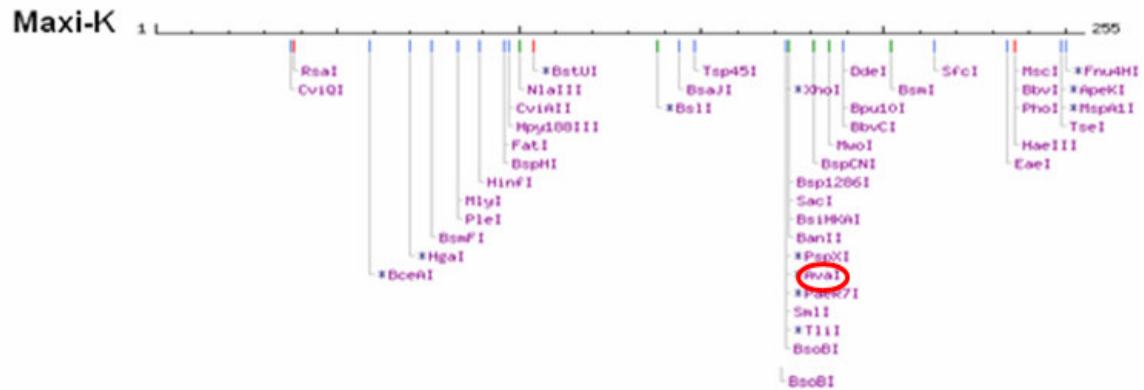


Figura 33. Análisis de los sitios de restricción del canal MaxiK-RCE1 y las enzimas que lo cortan. La enzima utilizada fue Aval señalada con un ovalo rojo.

En la figura 34 se muestra el análisis por restricción con la enzima Aval que generó un fragmento de 174 y uno de 82 pb en MaxiK-RCE1 de 3 días de cultivo. El análisis anterior indicó que los oligonucleótidos empleados (DsloF-DsloR), pueden amplificar el fragmento de MaxiK en RCE1 de manera específica.

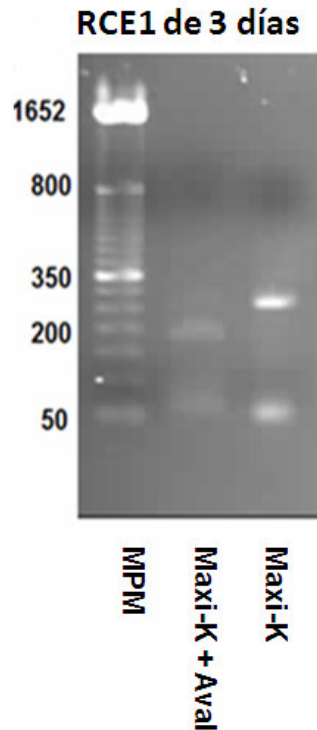


Figura 34. Amplificación y análisis de restricción del canal MaxiK-RCE1. Ensayo de PCR con oligonucleótidos DsloF-DsloR a 60°C x 35 ciclos. En el carril MPM se muestra la escalera de 50 pb de DNA Invitrogen. El carril Aval+Maxi-K corresponde a la restricción realizada y el carril Maxi-K es el control negativo. Gel de agarosa al 2%.

6.3. Identificación de los canales de calcio de la familia Ca_v1 en epitelio corneal

Debido a que los canales de calcio de la familia Ca_v1 también han sido reportada su expresión durante la proliferación celular en muchos tejidos, se verificó si estos canales se expresan en el epitelio corneal, ya se ha visto que son importantes reguladores del calcio que participa en los eventos intracelulares que gobiernan el crecimiento y la diferenciación celular.

6.3.1. Amplificación de canales de calcio de la familia Ca_v1

Los RNA mensajeros de los canales de calcio de la familia Ca_v1 en células RCE1 de 3 y 8 días de cultivo fueron amplificados demostrando su expresión en estas células (Figura 35). La amplificación de los canales de calcio de la familia Ca_v1 expresados en

las células RCE1 de 3 y 8 días, fue realizada mediante experimentos de RT-PCR, usando los oligonucleótidos CAV1F-CAV1R que se muestran en la sección de metodología en la tabla 1. El tamaño esperado fue de 352 pb como se indica en la figura 34. El nivel de expresión de células RCE1 fue interesantemente mayor a los 3 días en comparación con el de las células de 8 días, por otro lado en el ECC no fue posible amplificar los canales Ca_v1 , lo que sugiere que posiblemente están ausentes en este tejido ya diferenciado. La clonación, secuenciación e identificación de los canales calcio de la familia Ca_v1 amplificados en células RCE1 de 3 y 8 días no fue realizada debido a la falta de tiempo en este estudio, por lo que en futuros trabajos se realizará.

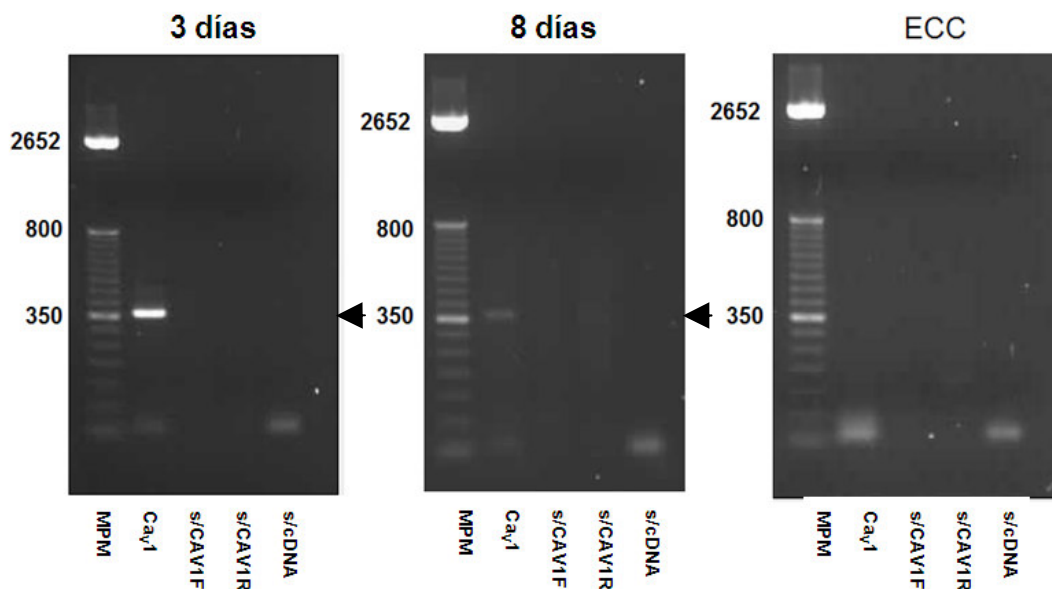


Figura 35. Expresión de canales iónicos de la familia Ca_v1 en células RCE1 y ECC con oligonucleótidos CAV1F-CAV1R. Amplificación del RNA total por RT-PCR a 60°C x 35 ciclos. El tamaño del fragmento esperado es de 352pb.

6.4. Efecto del TEA sobre el crecimiento de las células RCE1

Debido a que en el presente estudio se identificó la expresión de los canales $K_v1.1$, -1.4 , -1.6 y Maxi-K, el siguiente paso fue bloquear canales de K^+ con TEA y determinar si estos canales tienen algún efecto en la proliferación celular de las células RCE1.

Durante el cultivo celular de RCE1, la adición del bloqueador de canales de K^+ (TEA) al tercer día de cultivo, inhibe el crecimiento de las células RCE1 (Figura 36). La inhibición del crecimiento celular ocurre a partir de una concentración de 10 mM. Al usar una concentración de 50 mM de TEA en el cultivo celular, el número de células total no incrementa, inclusive disminuye a cero a los cuatro días. Lo anterior sugiere que la mayoría de los canales K^+ a partir de 10 mM están bloqueados y a 50 mM de TEA se observa toxicidad celular. Esto demuestra que posiblemente los canales de potasio están participando en la proliferación celular de las células RCE1 de epitelio corneal.

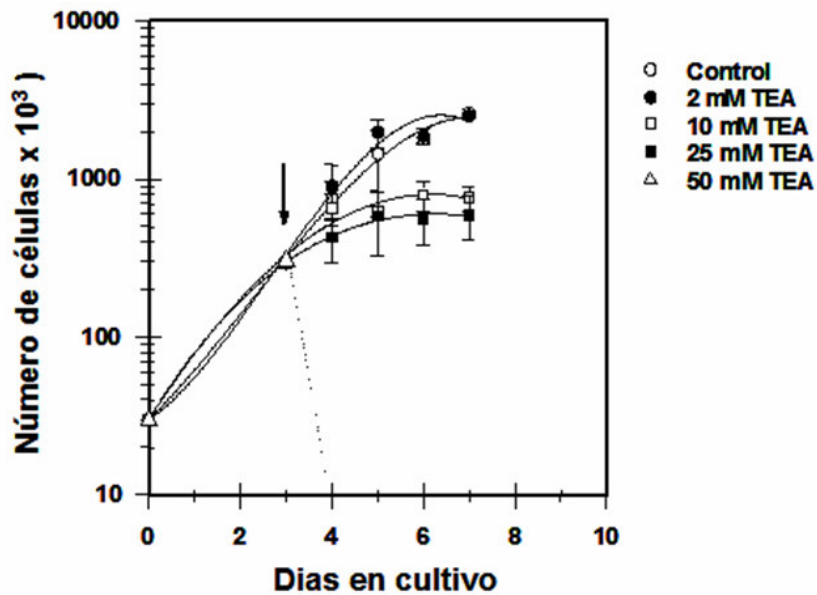


Figura 36. Cinética de crecimiento de células RCE1 en presencia del bloqueador de canales de potasio TEA. Se probaron las concentraciones de 2, 10, 25 y 50 mM de TEA. El bloqueador se agregó al tercer día de cultivo y se registrando el número de células cada 24 horas hasta el séptimo día.

7. Discusión

La función que realizan los canales de K^+ y de Ca^{2+} dependientes de voltaje en tejidos no excitables eléctricamente, aún no es bien conocida, aunque ya existen varios reportes en donde se evidencia su participación en fenómenos como, regulación del volumen celular, apoptosis, proliferación, etc. En nuestro caso particular estamos interesados en estudiar el papel de los canales de K^+ y de Ca^{2+} en la proliferación celular. En este estudio se demostró la expresión de canales de potasio de la familia K_v1 en la línea celular RCE1 y en el epitelio corneal, un tejido eléctricamente no excitable. La expresión fue demostrada por medio de RT-PCR con oligonucleótidos generales que se unen a todos los miembros de la familia K_v1 , una estrategia muy útil para amplificar RNAm con secuencias homólogas. La expresión de canales K_v1 se ha analizado en otros estudios, por ejemplo en células MDCK de riñón de perro, se detectaron tres distintos canales de la familia K_v1 : $K_v1.4$, -1.6 y -1.7 utilizando los mismos oligonucleótidos generales ($KV1F$ - $KV1R$) que se emplearon en el presente trabajo (García-Villegas *et al.*, 2007). Del mismo modo, en las células A2780 una línea celular de cáncer de ovario, se ha identificado la expresión de canales K_v1 por RT-PCR con oligonucleótidos diseñados a partir de las regiones conservadas del segmento S4 y la región del poro de múltiples canales K_v que incluyen los subtipos $K_v1.1$, -1.3 , -1.5 y -2.1 (Weng Z *et al.*, 2007). También en células de oligodendrocitos (OLGs) y progenitores de oligodendrocitos (OP) se ha reportado la expresión de múltiples transcritos de canales de K^+ activados por voltaje como son; $K_v1.2$, -1.4 , -1.5 y -1.6 por RT-PCR usando oligonucleótidos generales que se unen a los dominios conservados de secuencias de canales de la familia Shaker (Attali B *et al.*, 1997).

En el presente estudio, la clonación, secuenciación e identificación *in silico* permitió conocer los canales de K^+ de la familia K_v1 que están presentes en el epitelio corneal (Figura 26 B), ahora podemos decir que al menos se expresan los canales $K_v1.1$, -1.4 y -1.6 . Sin embargo, existen otros trabajos previos en donde también se ha

evidenciado la expresión de canales de K^+ en este tejido. Por ejemplo, en el epitelio corneal de rata se han realizado estudios utilizando un panel de anticuerpos específicos contra $K_v1.1$, -2.1 , -3.1 , -3.2 , -3.4 , -4.2 y -4.3 demostrando que el canal $K_v3.4$ es el más altamente expresado en extractos celulares y en preparaciones de membrana celular utilizando Western blot (Wang L *et al.*, 2004). Por otro lado se ha detectado la expresión del RNAm del canal Kir2.1 en epitelio corneal por RT-PCR, además de haber sido caracterizada su corriente iónica por medio de la técnica de fijación de voltajes (patch clamp) (Rae J *et al.*, 2000). Los estudios en donde se han identificado canales K_v , particularmente los canales K_v1 en el epitelio corneal son escasos, además en la línea celular RCE1 no existen estudios de este tipo, por lo que el presente trabajo es el primer estudio realizado en la línea celular RCE1 y la primera vez que se reporta la expresión de RNAm de canales de K^+ de la familia K_v1 en epitelio corneal.

Durante el análisis *in silico* de las secuencias obtenidas en este trabajo se determinó qué canales iónicos se están expresando en la línea celular RCE1 a nivel de RNA mensajero. Los canales de potasio de la familia K_v1 identificados fueron: $K_v1.1$, -1.4 y -1.6 (ver tabla 4, 5 y 6), siendo el canal $K_v1.1$ el que mayoritariamente se repitió en las clonas obtenidas, esto podría sugerir que el RNAm del canal $K_v1.1$ es más abundante que el de los canales $K_v1.4$ y -1.6 , aunque para afirmar lo anterior se tendrían que realizar estudios de PCR semicuantitativa o PCR en tiempo real. Quizás los niveles de expresión de los canales de K^+ de la familia Shaker, dependen del tipo de tejido en que se encuentren y la etapa del ciclo celular en que se halla la célula, ya que en cultivos de astrocitos de ratón, se ha visto que los RNA mensajeros de los canales $K_v1.1$ y -1.2 tienen niveles muy bajos, mientras que el del canal $K_v1.6$ está altamente expresado en este tejido (Sharon *et al.*, 1997). Por otra parte, en el presente trabajo faltaría realizar un estudio con anticuerpos específicos para cada uno de los canales de K^+ identificado y así poder saber si estos canales también se expresan a

nivel de proteína. Adicionalmente faltaría confirmar su presencia a nivel funcional haciendo estudios con registros electrofisiológicos para caracterizar sus corrientes.

El alineamiento de los canales $K_v1.1$, -1.4 y -1.6 evidenció las diferencias que existen en la región de 191 pb secuenciadas de cada canal, las cuales fueron suficientes para diseñar oligonucleótidos que servirán como herramientas moleculares para identificar a cada RNAm por separado en futuros trabajos en la línea celular RCE1 y en el epitelio corneal.

Por otra parte, también se realizó la identificación del RNAm del canal Maxi-K en la línea celular RCE1, sugiriendo que posiblemente este canal iónico está involucrado en alguna función de las células RCE1, ya que se expresa a los 3 y 8 días de cultivo. Anteriormente no se había reportado la expresión del canal de potasio Maxi-K en células RCE1, aunque se cree que este canal se encuentra en todos los tipos celulares cumpliendo funciones importantes como: el mantenimiento del potencial de reposo (Ashcroft, 2000). Respecto al nivel de expresión del RNAm de este canal, no se observó ningún cambio aparente, por lo que posiblemente la expresión del canal Maxi-K se mantiene constante durante la proliferación y diferenciación celular de las células RCE1. En células MDCK se han realizado estudios mediante RT-PCR semicuantitativa de los niveles del RNAm del canal Maxi-K, demostrando que el nivel de expresión aumenta 8 veces cuando las células se siembran y entran en contacto con el sustrato, sin embargo no se observó ningún efecto general de este canal en el crecimiento y diferenciación de las células MDCK (García-Villegas *et al.*, 2007). En este trabajo para verificar si realmente hay cambios en el nivel de expresión del canal de potasio Maxi-K en células RCE1, se tendrían que realizar estudios adicionales de PCR semicuantitativa ó PCR en tiempo real en células proliferando y células diferenciadas. De igual manera será necesario amplificar el canal Maxi-K en el epitelio corneal para verificar su presencia en el tejido ya diferenciado.

Con respecto a la amplificación de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje de la familia Ca_v1 en células RCE1 fue posible observar la presencia de RNAm tanto a los 3 días como a los 8 días de cultivo utilizando los oligonucleótidos generales (CAV1F-CAV1R). Sin embargo se observó una mayor expresión a los 3 días (Figura 35). Por el contrario, en el epitelio corneal no se logró la amplificación de canales Ca_v1 , lo que sugiere que posiblemente no se expresa este tipo de canales de Ca^{2+} en el tejido ya diferenciado. Hasta ahora se sabe que los canales de Ca_v1 participan en la actividad eléctrica de tejidos excitables, pero además también se han asociado a la transducción de señales que modulan la expresión genética a nivel transcripcional (Kahl y Means, 2003). Los resultados que se obtuvieron en este trabajo sobre la expresión de RNAm de canales de calcio Ca_v1 , podrían sugerir que las células RCE1 de 3 días están transcribiendo un mayor número de mensajeros de canales Ca_v1 , durante la etapa de proliferación celular y conforme se diferencian las células, disminuyen los niveles de RNAm de canales Ca_v1 . Esto coincidiría con la ausencia de la expresión de canales Ca_v1 en epitelio corneal (Figura 35).

En células mioblásticas ML-1 se ha reportado que la inducción de la diferenciación está asociada con la inhibición de la actividad de canales de K^+ (Lu *et al.*, 1993, Xu *et al.*, 1993 y Wang *et al.*, 1997). Sin embargo, en otros estudios se ha detectado la presencia de los canales de potasio K_v , pero la ausencia de canales de calcio en las células A2780, sugiriendo que los canales Ca_v1 no existen en células A2780 (Weng Z *et al.*, 2007). Posiblemente la presencia de los canales K_v en un tejido en proliferación ó diferenciación celular no siempre esta relacionado con la presencia de los canales de Ca^{2+} de la familia Ca_v1 . Por otra parte, para probar si los canales Ca_v1 están participando de manera general durante la proliferación celular de RCE1 en estudios futuros, sería necesario utilizar bloqueadores específicos, como las DHP en la cinética de crecimiento de células RCE1, además de identificar específicamente

que canales Ca_v1 ($Ca_v1.1$, -1.2 , -1.3 , -1.4) están presentes en este tejido por medio de clonación, secuenciación e identificación *in silico*.

Una vez identificando la identidad molecular de los de canales iónicos expresados en un tejido, las herramientas farmacológicas son una de las maneras de entender el rol de los canales de K^+ en la fisiología celular, pero a la vez son limitadas ya que muchas de ellas no son tan específicas dada la diversidad que existe de canales de K^+ . En las células RCE1 se empleó el bloqueador inespecífico de canales de K^+ TEA a distintas concentraciones (Figura 36). En otros estudios se ha reportado que el bloqueador TEA a 10 mM, bloquea la mayoría de los canales de potasio K_v (Wolosin *et al.*, 1987). Lo anterior coincide con los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento de las células RCE1. La inhibición del crecimiento de células RCE1 se logró a partir de 10 mM de TEA, lo que demuestra que al menos un canal de K^+ dependientes de voltaje, está participando en la proliferación celular de RCE1. Particularmente para el canal Maxi-K, en otros trabajos se ha visto bloqueada su actividad a 2 mM de TEA (Vogalis *et al.*, 2005), si la inhibición del crecimiento de células RCE1 ocurrió a partir de 10 mM, podríamos suponer que el canal Maxi-K posiblemente no este participando de manera directa en la proliferación celular. Sin embargo, para descartar de una manara más directa la participación del canal Maxi-K en la proliferación de células RCE1 habría que hacer una cinética de crecimiento en presencia de bloqueadores específicos para este canal como son: la Iberitoxina y la caribdotoxina, como se ha reportado en otros tipos celulares (Weng *et al.*, 2007). Aunque se ha reportado que el canal Maxi-K en células de cáncer de ovario A2780, no es crítico en la proliferación celular ya que no se afecta en presencia de Iberitoxina y Chtx. En este tipo de células, sin embargo, la proliferación es inhibida con el bloqueador 4-aminopiridina que inhibe canales de potasio K_v (Weng *et al.*, 2007).

Existen numerosos estudios de canales de K^+ involucrados en la proliferación celular. El caso mejor estudiado corresponde a los canales $K_v1.3$ y $K_{Ca}3.1$, quienes

gobiernan la respuesta mitogénica en linfocitos (DeCoursey *et al.*, 1984). En células de melanoma se expresan una diversidad de tipos de canales iónicos y se ha reportado que los bloqueadores de canales de K^+ inhiben su crecimiento (Allen *et al.*, 1997). En células cancerosas gástricas de humano, la actividad y expresión del canal $K_v1.1$ juega un importante rol en la proliferación celular (Lan, *et al.*, 1997). En músculo liso los canales de K^+ regulan la su proliferación celular (Jackson, 2005). Actualmente hay un gran número de reportes de distintos tipos celulares con que documentan el requerimiento de canales de K^+ funcionales para su proliferación celular como son: linfocitos, adipocitos, células de Schwann, melanoma, carcinoma de mama, neuroblastoma, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, células neuroendócrinas, hepatocitos, células pituitarias GH3, células endoteliales, queratinocitos, células del pigmento retinal, condrocitos, leucemia miblastica, cáncer de próstata, hepatocarcinoma, mesotelioma y células de cáncer de colon (Wonderlin y Strobl, 1996; Pardo, 2004).

En estudios futuros se podría emplear algún bloqueador mucho más específico para canales de potasio K_v y así tratar de determinar qué subtipo de canales de potasio K_v específicamente están involucrados en la proliferación celular de RCE1. Otra alternativa podría ser la sobre expresión de los canales K_v1 encontrados ($K_v1.1$, -1.4, -1.6) en las células RCE1 ó la inhibición de sus RNAm por medio de oligonucleótidos antisentido ó RNA de interferencia (RNAi). Aunque algunos canales de la familia K_v1 ya han sido estudiados en distintos tejidos, la función que ejercen de manera específica en la proliferación celular, aún se desconoce. Por ejemplo, valorar la sobre expresión de canales K_v1 en células progenitora de oligodendrocitos (OP), ha demostrando que la proliferación celular pueden ser disminuida con la sobre expresión del canal $K_v1.6$, sin embargo, se incrementa cuando se sobre expresan los canales $K_v1.3$ ó -1.4 (Vautier *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha probado que la línea celular de epitelio mucoso gástrico RGM-1 tiene altamente expresados los canales de potasio

K_v1.1 y 1.6. Al silenciar la expresión del canal K_v1.1 por medio de RNAi específicos, se suprime la proliferación celular, sugiriendo que el canal K_v1.1 regula la proliferación de células epiteliales gástricas (Ka Kei *et al.*, 2006). En células OP se probaron tres distintos bloqueadores de canales de K⁺: quinidina a 100 y 500 μM, clofilium a 10 μM y 4-aminopiridina a 3 mM logrando inhibir la proliferación celular en cada ensayo por separado, posteriormente se detectó el RNAm de los canales K_v1.5 y -1.6 lo que hacía creer que estos canales de K⁺ posiblemente estaban participando en la proliferación de OP. Se utilizaron oligonucleótidos antisentido contra K_v1.5 y -1.6 pero no hubo ningún efecto sobre el crecimiento celular, lo anterior sugirió que la participación en conjunto de los canales de K⁺ está implicada en la proliferación y no específicamente un canal de la familia K_v1 en particular (Attali *et al.*, 1997). También se ha propuesto que las células podrían expresar más de un tipo de canales de K⁺, y que la actividad de éstos para mantener su potencial eléctrico de reposo, sea lo que al modificarse afecte la proliferación. De modo que si la selectividad de un bloqueador inhibe una población de canales de K⁺ pero no otra, la segunda población de canales de K⁺ podría permitir la proliferación. En otros estudios se ha determinado que inclusive algunos canales de K⁺, por ejemplo: los canales de K⁺ activados por Ca²⁺ (K_{Ca}) participan en la proliferación celular, regulando la progresión de la fase G₀ hacia la fase G₁ del ciclo celular (Wonderlin *et al.*, 1996). Algunos autores han reportado que la participación del canal Maxi-K en la proliferación celular, depende del tejido que se analice. Por ejemplo, los canales de K⁺ activados por Ca²⁺ (K_{Ca}) dentro de los cuales se encuentra Maxi-K, se han asociado más con la proliferación celular en las células cancerosas de mama, que en otros tejidos (Allen *et al.*, 1997). Probablemente al emplear un bloqueador específico para el canal Maxi-K, como la Caribdotoxina en la cinética de crecimiento de células RCE1, nos permitiría demostrar si el canal Maxi-K, está participando de manera más específica en el proceso de proliferación celular de RCE1. Los estudios electrofisiológicos, el empleo de RNAi y la sobre expresión del

canal Maxi-K, son otras estrategias que se podrían utilizar para comprender el rol que juega el canal Maxi-K en la fisiología de las células RCE1.

Finalmente la inhibición de la proliferación celular por bloqueadores de canales iónicos es necesaria, pero no es suficiente para saber que tipo de canales de K^+ y Ca^{2+} están participando durante la proliferación celular. Sin embargo, algunos autores han descrito de manera general que los canales de potasio K_V específicamente, pueden modular la proliferación celular por varios mecanismos. A) Se cree que se requiere una hiperpolarización transitoria para la progresión de la fase temprana G_1 del ciclo celular. Así, el bloqueo de los canales K_V resulta en una despolarización que suprime la proliferación celular por la inhibición de tal hiperpolarización (Pardo, 2004; Wonderlin y Strobl, 1996). B) Se ha reportado que la expresión de canales de potasio K_V puede incrementar el gradiente electroquímico para Ca^{2+} (Wang *et al.*, 2000). Los elevados niveles de Ca^{2+} intracelular incrementan la actividad de algunas enzimas, incluyendo la cinasa tipo II dependiente de Ca^{2+} calmodulina, la cual puede potenciar la progresión del ciclo celular (Kahl y Means, 2003). De igual manera se ha demostrado que otras enzimas dependientes de Ca^{2+} pueden regular la activación de ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas, que a la vez su actividad es responsable de la progresión del ciclo celular (Santella, 1998). Por último, C) La proliferación también está asociada con el volumen celular a lo largo de la fase G_1 ya que controla la concentración de solutos necesarios para soportar la proliferación (Rouzair-Dubois *et al.*, 2004). Los cambios en el potencial de membrana y el volumen celular son necesarios para la progresión del ciclo celular y ambos requieren la acción de los canales de K^+ (Pardo, 2004).

En resumen, la identificación molecular de la expresión de los canales de potasio $K_V1.1$, -1.4 y -1.6 así como del canal Maxi-K en células de epitelio corneal RCE1 realizada en este trabajo, es el primer paso en el estudio del papel funcional de estos canales en el epitelio corneal, su proliferación y probablemente su diferenciación. Este trabajo abre las puertas hacia nuevas líneas de investigación, por un lado identificar

molecularmente cual es el ó los canales de K^+ necesarios para la proliferación de las células RCE1 y por otro lado, esclarecer cuáles son las funciones celulares en las que participan los canales $K_v1.1$, -1.4 , -1.6 y Maxi-K.

8. Conclusiones

La línea celular RCE1 y el epitelio corneal expresan RNAm de canales de potasio K_v1 (K_v 1.1, -1.4 y -1.6). Las diferencias que presentan las secuencias de $K_v1.1$, -1.4 y -1.6 fueron suficientes para diseñar oligonucleótidos específicos que amplifican a cada canal por separado. Por otro lado el crecimiento de las células RCE1 en fase exponencial es inhibido en presencia del bloqueador TEA, a partir de 10 mM, lo que demuestra que los canales de K^+ de manera general están participando en la proliferación celular de RCE1.

La línea celular RCE1 de 3 y 8 días expresa RNA mensajero del canal Maxi-K sin ningún cambio aparente en el nivel de expresión.

Las células RCE1 a los 3 días tienen una mayor expresión de RNAm de canales Ca_v1 que a los 8 días, mientras que en el epitelio corneal no se expresan los canales Ca_v1 . Esto sugiere una mayor expresión de Ca_v1 durante el crecimiento exponencial del cultivo.

Este estudio finalmente nos permitió demostrar la expresión de canales dependientes de voltaje en un tejido no excitable eléctricamente, y que los canales de K^+ están participando en la proliferación celular de RCE1.

9. Referencias

- ❖ Akaike N, Brown AM, Nishi K, Tsuda Y. 1981. Actions of verapamil, diltiazem and other divalent cations on the calcium current of helix neurones. *Br J Pharmacol* 74; 87–95.
- ❖ Allen DH, Lepple-Wienhues A, Cahalan MD. 1997. Ion channel phenotype of melanoma cell line. *J. Membrane Biol*; 155:27-34.
- ❖ Archer SL, Huang JM, Hampf V, Nelson DP, Shulte PJ, Weir EK. 1994. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K⁺ channel by cGMP-dependent protein Kinase. *Proc. Natl. Acad Sci USA*; 91 (16): 7583-7.
- ❖ Armstrong, C.M. y Hille, B. 1998. Voltage-gated ion channels and electrical excitability. *Neuron*. 20; 371-380.
- ❖ Ashcroft, F.M. 2000. Ion Channels and Disease (San Diego, CA: novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is Academic Press).
- ❖ Attali B, Wang N, Kolot A, Sobko A, Cherepanov V, Soliven B. 1997. Characterization of Delayed Rectifier Kv Channels in Oligodendrocytes and Progenitor Cells. *J Neurosci*; 17(21):8234-8245.
- ❖ Bernstein, J. 1902. Untersuchungen zur Thermodynamik der bioelectrischen Ströme. *Pfluegers Arch*. 92: 521-562.
- ❖ Bernstein, J. 1912. Elektrobiologie. Die Lehre von den elektrischen Vorgängen im Organismus auf moderner Grundlage dargestellt. Braunschweig: Vieweg & Sohn.
- ❖ Buhler FR, de Leeuw PW, Doyle AE, Fleckenstein A, Fleckenstein-Grun G, Frishman WH, and Zanchetti A. 1984. Proceeding of a symposium: Calcium metabolism and calcium channel blockers for understanding and treating hypertension. *Am. J. Med*; 77 (6B): 1-23.
- ❖ Cahalan, M.D. y Chandy, G.K. 1997. Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression. *Curr. Opi. Biotech*. 8; 749-756.
- ❖ Campbell, K.P., Leung, A.T. y Sharp, A.H. 1988. The biochemistry and molecular biology of the dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Trends Neurosci*. 11(10), 425-430.
- ❖ Catterall, W. A. 1991. Functional Subunit Structure of Voltage-Calcium channels. *Science* 253;1499-1500.
- ❖ Ceña V, Stutein A, and Rojas E. 1989. Effects of calcium and Bay K-8644 on calcium currents in adrenal medullary chromaffin cells. *J Membr Biol*; 112 (3): 255-65.
- ❖ Chandy , K.G., Douglas, J., Gutman, G.A., Jan, L., Joho, R., Kaczmarek, L., MacKinnon, D., North, R.A., Numa, S., Philipson, L. y cols. 1991. A simplified gene nomenclature. *Nature (Lond)*. 352, 26.
- ❖ Chemin J, Monteil A, Lory P. 2003. Functional specificity of T-type calcium channels and their roles in neuronal differentiation. *J Soc Biol*.197; 235–247.
- ❖ Chiu SY and Wilson GF. 1989. The role of potassium channels in Schwann cell proliferation in wallerian degeneration of explants rabbit sciatic nerves. *J Physiol*; 408: 199-222.
- ❖ Christie, M.J., North, R.A., Osborne, P.B., Douglass, J. y Adelman, J.P. 1990. Heteropolymeric potassium channels expressed in Xenopus oocytes from clones subunits. *Neuron*, 2; 405-411.

- ❖ Curtis BM, and Catterall WA. 1984. Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry*; 23 (10): 2113-8.
- ❖ Deal, K.K., England, S.K. y Tamkun, M.M. 1996. Molecular physiology of cardiac potassium channels. *Physiol. Rev.* 76; 49-67.
- ❖ DeCoursey TE, Chandy KG, Gupta S, y Cahalan MD. 1984. Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis?. *Nature*: 307: 465-468.
- ❖ Deutsch, C. y Chen, Li-Qiong. 1993. Heterologous expression of specific K⁺ channels in T lymphocytes. Functional consequences for volume regulation. *Proc. Natl. Acad. USA.* 90; 10036-10040.
- ❖ Doyle, D.A., Morais-Cabral, J., Pfuetzner, A.K., Gulbis, J.M., Cohen, S.T., Chait, B.T. y MacKinnon. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science.* 280; 69-77.
- ❖ Fisher M, and Grotta J. 1993. New uses for calcium channels blockers. Therapeutic implications. *Drugs*; 46 (6): 961-75.
- ❖ Garcia-Calvo M, Leonard RJ, Novick J, Sterens SP, Schmalhofer W, Kaczorowski GJ, and García ML. 1993. Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxina a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. *J. Biol. Chem.* 5; 268 (25):18866-74.
- ❖ García-Villegas R, Escamilla J, Florentino R, Cerejido M. 2007. Potassium Channels Lost During Harvesting of Epithelial Cells, are Restored with a Kinetics that Depends on Channel Species. *Cell Physiol Biochem*; 20:405-416.
- ❖ García-Villegas R, Escamilla J., Sanchez-Guzman, Pasten A, Hernandez-Quitero, Gómez-Flores E, and Castro-Muñozledo. 2009. Pax-6 expressed early in the differentiation of a corneal epithelial model system. *J Cell Physiol.* En revision.
- ❖ Gulbis, J.M., Zhou, M., Mann, S. y MacKinnon, R. 2000. Structure of the cytoplasmic b subunit- T1 assembly of voltage-dependent K⁺ channels. *Science.* 289; 123-127.
- ❖ Gutman, G.A. y Chandy, K.G. 1993. Nomenclature for vertebrate voltage-gated K⁺ channels. *Sem. Neurosci.* 5; 101-106.
- ❖ Gutman, G.A., Chandy, G.K., Adelman, J.P., Aiyar, J., Bayliss, D.A., Clapham, D.E. Covarrubias, M., Desir, G.V., Furuichi, K., Ganetzky, B. y cols. 2003. International union of pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol. Rev.* 55; 583-586.
- ❖ Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. y Sigworth, F.J. 1981. Improved patch clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pfuegers Arch.* 391, 85-100.
- ❖ Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T. y MacKinnon, R. 1994. Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *J. Biophys.* 66; 1061-1067.
- ❖ Hille, B. 1968. Pharmacological modifications of the sodium channels of frog nerve. *J. Gen. Physiol.* 51; 221-236.
- ❖ Hodgkin, A.L. y Huxley, A.F. 1939. Action potentials recorded from inside a nerve fibre. *Nature Lond.* 144; 710-711.
- ❖ Hodgkin, A.L. y Huxley, A.F. 1945. Resting and action potentials in single nerve fibres. *J. Physiol. Lond.* 104; 176-195.

- ❖ Hodgkin, A.L. y Huxley, A.F. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol. Lond.* 117; 500-544.
- ❖ Hodgkin, A.L. y Huxley, A.F. 1952. The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. *J. Physiol. Lond.* 116; 473-496.
- ❖ Hodgkin, A.L. y Katz, B. 1949. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Physiol. Lond.* 108; 37-77.
- ❖ Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. y Katz, B. 1952. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. *J. Physiol. Lond.* 116; 424-448.
- ❖ Isacoff, E.Y., Jan Y.N. y Jan, L.Y. 1990. Evidence for the formation of heteromultimeric potassium channels in *Xenopus* oocytes. *Nature.* 345; 530-534.
- ❖ Jackson WF. 2005. Potassium channels and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circ Res*; 97:1211-2.
- ❖ Jan, L. Y., and Y. N. Jan. 1997. Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu. Rev. Neurosci.* 20: 91–123.
- ❖ Kaczorowski, G. J., H.-G. Knaus, R. J. Leonard, O. B. McManus, and M. L. Garcia. 1996. High conductance calcium-activated potassium channels; structure, pharmacology, and function. *J. Bionerg. Biomem.* 28: 255–267.
- ❖ Kahl CR, Means AR. 2003. Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. *Endocr Rev*; 24: 719-738.
- ❖ Kei-Wu W. K, Rong-Li G, Shan-Wong H. P., Cheung-Hui M. K., Ki-Tai E. K., Yee-Lam E. K., Shin V. Y., Ni-Ye Y., Li P, Hua-Yang Y., Chyuan-Luo J., y Hin-Cho C. 2006. Involvement of Kv1.1 and Nav1.5 in Proliferation of Gastric Epithelial Cells. *J Cell Physiol*; 207:437-444.
- ❖ Klyce SD, and Wong RK. 1977. Site and mode of adrenaline action on chloride transport across the rabbit corneal epithelium. *J. Physiol*; 266 (3): 777-99.
- ❖ Kuga T, Kobayashi S, Hirakawa Y, Kanaide H, Takeshita A. 1996. Cell cycle-dependent expression of L- and T-type Ca^{2+} currents in rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *Circ Res.* 79; 14–19.
- ❖ Lan M, Shi Y, Han Z, Hao Z, Pan Y, Liu N., *et al.* 1997. Expression of delayed rectifier potassium channels and their possible roles in proliferation of human gastric cancer cells. *Cancer Biol Ther*; 4:1342-7.
- ❖ Lang F, Ritter M, Gamper N, Huber S, Fillon S, Tanneur V, Lepplé-Wienhues A, Szabo I, and Gulbins E. 2000. Cell volume in the regulation of cell proliferation and volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. *Cell Physiol Biochem*; 10 (5-6): 417-28.
- ❖ Latorre R, Vergara C, Alvarez O, Stefani E, and Toro L. 2000. Voltage-gated calcium-modulated potassium channels of large unitary conductance: structure, diversity, and pharmacology. In: *Pharmacology of Ionic Channel Function*, edited by Endo M, Kurachi Y, and Mishina M. Berlin: *Springer Verlag*, 197-223.
- ❖ Lepplé-Wienhues A, Stahl F, Wonderling, Wiederholt M, 1992. Effects of endothelin and calcium channel blockers on membrane voltage and intracellular calcium in cultured bovine trabecular mesh work cells. *Ger J Ophthalmol*; 1 (3-4): 159-63.

- ❖ Lu L, Reinach PS, Kao WW. 2001. Corneal epithelial wound healing. *Exp Biol Med* (Maywood) 226:653–664.
- ❖ Lu, L., Yang, T., Markakis, D., Guggino, W.B., Craig, R.W. 1993. Alterations in a voltage-gated K⁺ current during the differentiation of ML-1 human myeloblastic leukemia cells. *J. Membrane Biol*; 132:267–274.
- ❖ MacKinnon, R. 1991. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage activated potassium channel. *Nature (Lond)*. 350; 232-235.
- ❖ McCleskey, E.W. 1994. Calcium channels: cellular roles and molecular mechanisms. *Curr. Opin. New obiol.* 4; 304-312.
- ❖ McManus, O.B. 1991. Calcium-activated potassium channels: regulation by calcium. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 23; 537-560.
- ❖ McRory JE, Santi CM, Hamming KS et al. 2001. Molecular and functional characterization of a family of rat brain T-type calcium channels. *J Biol Chem*. 276; 3999–4011.
- ❖ Miller C, Moczydlowski E, Latorre K, Phillips M. 1985. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺ activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature*; 24-30; 313 (6000): 316-8.
- ❖ Narahashi, T., Moore, J.W. y Scott, W.R. 1964. Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons. *J. Gen. Physiol.* 47; 965-974.
- ❖ Neher, E. Y Sackmann, B. 1976. Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature Lond*. 260; 799-802.
- ❖ Nilius B, and Wohlrab W. 1992. Potassium channels and regulation of proliferation of human melanoma cells. *J Physiol*; 445: 537-48.
- ❖ Nilius B, Schwarz G, and Droogmans. 1993. Control of intracellular calcium by membrane potential in human melanoma cells. *Am. J. Physiol*; 265 (6ptl): C1501-10.
- ❖ Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Kakayama, Y., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H., Raftery, M.A., Hirose, T., Inayama, S., Hayashida, H., Miyatta, T. y Numa, S. 1984. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature*. 312, 121-127.
- ❖ Olcese R, Qin N, Schneider T, Neely A, Wei X, Stefani E, and Birnbaumer L. 1994. The amino terminus of a calcium channel beta subunit sets rates of a calcium channel beta subunit sets rates of channel inactivation independently of the subunit's effect on activation. *Neuron*; 13: 1433-8.
- ❖ Orio, P., Rojas, P., Ferreira, G., y Latorre R. 2002. New Disguises for an Old Channel: MaxiK Channel β -subunits. *New Physiol Sci*. 17; 156-161.
- ❖ Panner A, Cribbs LL, Zainelli GM, Origitano TC, Singh S, Wurster RD. 2005. Variation of T-type calcium channel protein expression affects cell division of cultured tumor cells. *Cell Calcium*. 37; 105–119.
- ❖ Papazian, D.M., Schwarz, T.L., Tempel, B.L., Jan, Y.N. y Jan, L.Y. 1987. Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science*. 237; 749-753.
- ❖ Pappone PA, and Ortiz-Miranda SI, 1993. Blockers of voltage-gated K⁺ channels inhibit proliferation of cultured brown fat cells. *Am J Physiol*; 264 (4 ptl): C1014-9.

- ❖ Pardo L, 2004. Voltage-Gated Potassium Channels in Cell Proliferation. *Physiol*; 19:285-292.
- ❖ Pedarzani P, and Stocker. 2008. Molecular and cellular basis of small and intermediate-conductance, calcium-activated potassium channel function in the brain. *Cell Mol Life Sc*; 65: 3196-3217.
- ❖ Perez-Reyes, E. Schneider, T. 1995. Molecular biology of calcium channels. *Kidney Internacional*. 48; 1111-1124.
- ❖ Perez-Reyes E. 1998. Molecular characterization of a novel family of low voltage activated, T-type, calcium channels. *J Bioenerg Biomembr*. 30; 313–318.
- ❖ Rae JL, and Farrugia G. 1992. Whole-cell potassium current in rabbit corneal epithelium activated by fenamates. *J Membr. Biol*; 129 (1): 81-97.
- ❖ Rae J, Shepard A. 2000. Kir 2.1 Potassium channels and corneal epithelium. *Curr Eye Res*; 20:144-152.
- ❖ Rouzair-Dubois B, Gerard V, and Doubois JM. 1993. Involvement of K⁺ channels in the quercetin-induced inhibition of neuroblastoma cell growth. *Pflugers Arch*; 423 (3-4): 202-5.
- ❖ Rouzair-Dubois B, Malo M, Milandri JB, Doubois JM. 2004. Cell size-proliferation relationship in rat glioma cells. *Glio*; 45:249-257.
- ❖ Ruppertsberg, J.P., Schroter, K.H., Sakmann, B., Stocker, M., Sewing, S. y Pongs, O. 1990. Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium channel proteins. *Nature*. 345; 535-537.
- ❖ Santella L. 1998. The role of calcium in the cell cycle: Facts and hypotheses. *Biochem Biophys Res Commun*; 244:317-324.
- ❖ Sharon L. Smart, Martha M, Bosma, Bruce L. Tempel. 1997. Identification of the Delayed Rectifier Potassium Channel, Kv1.6, in Cultured Astrocytes. *Glia*; 20:127-134.
- ❖ Silver RB. 1999. Imaging structured space-time patterns of Ca²⁺ signals: essential information for decisions in cell division. *FASEB J* 13(Suppl 2):S209–S215.
- ❖ Storm JF, 1987. Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol*; 385:733-59.
- ❖ Strobl JS, Wonderlin WF, and Flynn DC. 1995. Mitogenic signal transduction in human breast cancer cells. *Gen Pharmacol*; 26 (6): 1643-9.
- ❖ Szabò. I., Adams, C. y Gulbins, E. 2004. Ion channels and membrane rafts in apoptosis. *Eur. J. Physiol*. 448; 304-312.
- ❖ Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, Flockerzi V, Takahashi H, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Hirose T, and Numa S. 1987. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature*; 23-29: 328 (6128).
- ❖ Trimmer, J.S. 1993. Expression of delayed rectifier K⁺ channel isoforms in the developing rat brain. *FEBS Lett*. 324; 205-210.
- ❖ Tsien, R.W., Ellinor, P.T. Horne, W.A. 1991. Molecular diversity of voltage dependent calcium channels. *Trends Pharmacol. Sci*. 12; 349-354.

- ❖ Vautier F, Belachew S, Chittajallu R, Gallo V. 2004. *Shaker*-Tipo Potassium Channel Subunits Differentially Control Oligodendrocyte Progenitor Proliferation. *GLIA*; 48:337-345.
- ❖ Villereal ML, Cook JS. 1978. Regulation of active amino acid transport by growth-related changes in membrane potential in a human fibroblast. *J Biol Chem*; 253 (22): 8257-62.
- ❖ Vogalis F, Hegg CC, Lucero MT., 2005. Ionic conductances in sustentacular cells of the mouse olfactory epithelium. *J Physiol* ; 562:785-799.
- ❖ Wang L, Fyffe R. E. W, Lu L. 2004. Identification of a Kv3.4 Channel in Corneal Epithelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 45:1796-1803.
- ❖ Wang, L., Xu, B., White, R.E., Lu, L. 1997. Growth factor-mediated K⁺ channel activity associated with human myeloblastic ML-1 cell proliferation. *Am. J. Physiol*; 273:C1657–C1665.
- ❖ Wang JY, Wang J, Golovina VA, Li L, Platoshyn O, Yuan JX. 2000. Role of K⁺ channel expression in polyamine-dependent intestinal epithelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol*; 278:C303-C314.
- ❖ Weng Z, Pan X, Cui N, Wang S, Wang Bo. 2007. Voltage-gated K⁺ channels are associated with cell proliferation and cell cycle of ovarian cancer cell. *Gynecologic Oncology* 104:455-460.
- ❖ Whitfield JF, Bird RP, Chakravarthy BR, Isaacs RJ, Morley P. 1995. Calcium-cell cycle regulator, differentiator, killer, chemopreventor, and maybe, tumor promoter. *J Cell Biochem Suppl.* 22; 74–91.
- ❖ William Ka Kei Wu, Gui Rong Li, Helen Pui Shan Wong, Marco King Cheung Hui, Emily Kin Ki Tai, Emily Kai Yee Lam, Vivian Yvonne Shin, Yi Ni Ye, Peng Li, Ying Hua Yang, Jiing Chyuan Luo, and Chi Hin Cho. 2006. Involvement of Kv1.1 and Nav1.5 in Proliferation of Gastric Epithelial Cells. *J Cell Physiol*; 207:437-444.
- ❖ Wolosin JM, Candia OA., 1987. Cl⁻ secretagogues increase basolateral K⁺ conductance of frog corneal epithelium. *Am J Physiol*; 253:C555-C560.
- ❖ Wonderlin, W.F. y Strobl, J.L. 1996. Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J. Membrane. Biol.* 154; 91-107.
- ❖ Xu, B., Wilson, B.A., Lu, L. 1996. Induction of human myeloblastic ML-1 cell G1 arrest by suppression of K⁺ channel activity. *Am. J. Physiol*; 271:C2037–C2044.
- ❖ Zhang, J.F., Randall, A.D., Ellinor, P.T., Horne, W. Al, Sather, W.A., Tanabe, T., Schwarz, T.L., y Tsien, R.W. 1993. Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca²⁺ channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* 32(11), 1075-1088.
- ❖ Zhou, M., Morais-Cabral, J.H., Mann, S., y MacKinnon, R. 2001. Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature.* 411; 657-661.