



Benemérita



**Universidad Autónoma de
Puebla**



Facultad de Medicina

**Mutación sitio-dirigida del aa F1760 en el gen
que codifica para el canal de sodio
dependiente de voltaje $hNa_v1.5$**

Tesis para obtener el título de:

LICENCIADA EN BIOMEDICINA

Presenta:

Ivonne Ramírez Díaz

Director experto y metodológico:

D.C. Eduardo M. Salinas Stefanón

Codirectora:

D.C. Lourdes Millán Pérez Peña

Puebla, Pue., Abril 2018

MIS AGRADECIMIENTOS.

A mi papá Laurencio Ramírez y a mi maravillosa madre Adela Díaz, que con todo su apoyo y amor hicieron posible que yo terminara esta fase de mi vida académica.

Al D.C. Alfredo, a la D.C. Lourdes, al D.C. Eduardo y a la M.C. Claudia por haber sido mis guías y profesores para poder desarrollar este trabajo.

A mis amigos Tomás Francisco Maya y Ángel Sánchez por hacer amena la vida universitaria con su sentido del humor y su grandiosa amistad.

Un agradecimiento especial al D.C. Luis Ángel Flores Mejía y al Dr. Juan Carlos Flores Mejía ya que por ellos fue que inicié mi interés por querer ser parte de la admirable comunidad que genera el conocimiento científico.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	5
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
ANTECEDENTES	10
1 Canales iónicos.	10
1.1 Canales iónicos dependientes de voltaje.	13
1.2 Canales de sodio dependientes de voltaje.	15
1.2.1 Subunidad alfa	17
1.2.2 Subunidades beta	20
1.2.3 Propiedades biofísicas.	21
1.3 Efecto de anestésicos locales sobre el canal de sodio.	23
1.3.1 Anestésicos locales.	24
1.4 Canal de sodio dependiente de voltaje hNav1.5	26
1.5 Antecedentes específicos.	27
2 Planteamiento del problema	28
3 Objetivos	29
3.1 Objetivo General.	29
3.2 Objetivos Específicos.	29
4 Material y Métodos	30
4.1 Comprobación de la integridad del plásmido a usar.	30
4.1.1 Digestión enzimática.	30
4.1.2 Electroforesis.	31
4.2 Diseño de oligonucleótidos mutagénicos.	31
4.3 Mutagénesis sitio dirigida.	32
4.3.1 PCR en gradiente de temperaturas.	33
4.3.2 PCR punto final.	34
4.3.3 Preparación de bacterias competentes y transformación.	36
4.4 Mini preparación de ADN plasmídico por ebullición.	37
4.4.1 Restricción con enzima BamHI.	38
4.5 Purificación pSP64t/Hh1 mutado.	39

4.5.1	Amplificación de bacterias transformadas.....	39
4.5.2	Extracción de ADN plasmídico ultrapuro.....	39
4.6	Secuenciación y alineamiento múltiple.....	40
5	Resultados.....	41
5.1	Comprobación de la integridad del plásmido usado.....	41
5.2	Oligonucleótidos mutagénicos.....	42
5.3	Producto de PCR en gradiente.....	42
5.4	Mutagénesis.....	43
5.4	Visualización del producto de PCR punto final digerido con DpnI.....	43
5.5	Transformación bacteriana.....	44
5.6	Mini preparación de las colonias transformadas.....	44
5.6.1	Cuantificación.....	44
5.6.2	Restricción.....	45
5.7	Mapa de restricción del ADN plasmídico ultrapuro.....	46
5.8	Secuenciación y alineamiento múltiple.....	47
6	Discusión.....	48
7	Conclusión.....	51
8	Bibliografía.....	52
ANEXO 1	57
ANEXO 2	58

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.....	10
FIGURA 2.....	12
FIGURA 3.....	15
FIGURA 4.....	17
FIGURA 5.....	19
FIGURA 6.....	19
FIGURA 7.....	21
FIGURA 8.....	23
FIGURA 9.....	24
FIGURA 10.....	24
FIGURA 11.....	25
FIGURA 12.....	26
FIGURA 13.....	30
FIGURA 14.....	33
FIGURA 15.....	41
FIGURA 16.....	43
FIGURA 17.....	43
FIGURA 18.....	44
FIGURA 19.....	45
FIGURA 20.....	46
FIGURA 21.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.....	10
TABLA 2.....	18
TABLA 3.....	20
TABLA 4.....	33
TABLA 5.....	34
TABLA 6.....	34
TABLA 7.....	35
TABLA 8.....	42
TABLA 9.....	45

ABREVIATURAS

Em	Potencial de membrana
Ala/A	Aminoácido Alanina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AL	Anestésicos locales
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BamHI	Enzima de restricción obtenida de la bacteria <i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>
DI	Dominio I
DII	Dominio II
DIII	Dominio III
DIV	Dominio IV
dNTPs	<i>Desoxinucleósidos trifosfato</i>
DpnI	Enzima de restricción derivada de la bacteria <i>Diplococcus pneumoniae</i>
ADNds	Ácido desoxirribonucleico de doble cadena
EC ₅₀	Concentración efectiva al 50%
Phe/F	Aminoácido fenilalanina
GC	Nucleótidos guanina y citocina
hH1	Nombre del canal de sodio cardiaco de humano
Pfu pol	Polimerasa derivada de la bacteria extremófila <i>Pirococcus furiosus</i>
IFMT	Aminoácidos que forman el motivo de inactivación: isoleucina, fenilalanina, metionina y treonina.
I _{Na}	Corriente de sodio
Lys/K	Aminoácido lisina
Nav	Canal de sodio dependiente de voltaje
Nav1.5	Isoforma del canal de sodio expresado en tejido cardiaco
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pSP64T	Plásmido de clonación
Ar/R	Aminoácido arginina
SCN1A	Gen que codifica la isoforma Nav1.1
SCN11A	Gen que codifica la isoforma Nav1.9
SCN5A	Gen que codifica la isoforma Nav1.5
SCNB1	Gen que codifica la subunidad beta 1
SCNB4	Gen que codifica la subunidad beta 4
SI	Segmento transmembranal I
SII	Segmento transmembranal II
SIII	Segmento transmembranal III
SIV	Segmento transmembranal IV
SV	Segmento transmembranal V
SVI	Segmento transmembranal VI
T _m	Temperatura de hibridación
TTX	Tetrodotoxina botulínica
α	Subunidad alfa
β	Subunidad beta

RESUMEN

En los últimos años ha incrementado el interés por desarrollar bloqueadores con alta especificidad para algunas isoformas de los Na_v , por lo que la caracterización de sitios de unión dentro de la proteína para diferentes moléculas o drogas, es uno de los puntos más importantes en investigación básica para el posterior desarrollo de fármacos y predecir así sus respuestas biológicas a algún tratamiento. En el laboratorio de Biofísica Cardíaca se ha estudiado el efecto del fármaco JNJ7777120 (el cual se ha visto posee un efecto antihiperálgico y antinociceptivo) sobre la isoforma $Na_v1.4$ nativa para investigar si su efecto se debe a que genera un tipo de bloqueo de los canales de sodio, por lo que para sustentar la hipótesis se requirió la generación de la proteína mutada en el principal aminoácido o sitio de unión a anestésicos locales "F1579", obteniendo así la proteína mutada $rNa_v1.4/F1579A$, sin embargo el estudio debe extenderse hacia otras isoformas para sustentar de una mejor manera el estudio del fármaco ya mencionado, es por eso que en este trabajo experimental se generó la mutación del mismo aminoácido correspondiente al sitio de unión de AL en el canal $Na_v1.5$ mediante técnicas de biología molecular, la cual se comprobó por secuenciación y la funcionalidad por métodos biofísicos.

INTRODUCCIÓN.

Los canales iónicos dependientes de voltaje, son proteínas integrales de membrana que funcionan como poros macromoleculares fundamentales para la generación y propagación de potenciales de acción en células excitables como neuronas, células de músculo cardíaco y esquelético al permitir el paso de moléculas cargadas como aniones y cationes cuando son activados en respuesta a un cambio del potencial de membrana o diferencia de voltaje de la membrana celular en el que están expresados; los hay de varios tipos, su clasificación depende del ion al que son permeables principalmente, siendo los más importantes los canales de potasio, calcio, sodio y cloro (Ruben 2014; Catterall, 2014). En el presente trabajo, el principal objeto de estudio es el canal dependiente de voltaje Nav1.5, que en mamíferos se expresa generalmente en músculo cardíaco, el gen que lo codifica es denominado SCN5A que fue por primera vez clonado, secuenciado y funcionalmente expresado en el año 1991 (Gellens et al., 1992). Ésta isoforma ha sido una de las más estudiadas para caracterizar los efectos que generan algunos fármacos sobre la cinética del canal, ya que como se ha mencionado, se expresa en células cardíacas, por tanto, este tipo de estudios han sido la base para iniciar el desarrollo de fármacos con capacidad de ayudar al tratamiento de alguna clase de arritmias cardíacas; los anestésicos locales por ejemplo, se sabe que su sitio de unión a los canales de Nav se comprende de un conjunto de aminoácidos donde resalta la participación de una Fenilalanina, que es la que se une en mayor proporción al anestésico local para generar así el bloqueo de la corriente de sodio, lo cual se ha comprobado al mutar ese aminoácido por otro que elimine su función en la proteína (McNulty et al., 2007; O'Reilly et al., 2012).

ANTECEDENTES

1 Canales iónicos.

Debido a la naturaleza lipídica de la membrana plasmática, es impermeable a la mayoría de las moléculas polares, entre ellas las inorgánicas cargadas (iones), que por su misma carga y alto grado de hidratación no son capaces de atravesar la bicapa lipídica hidrocarbonada (Figura 1).

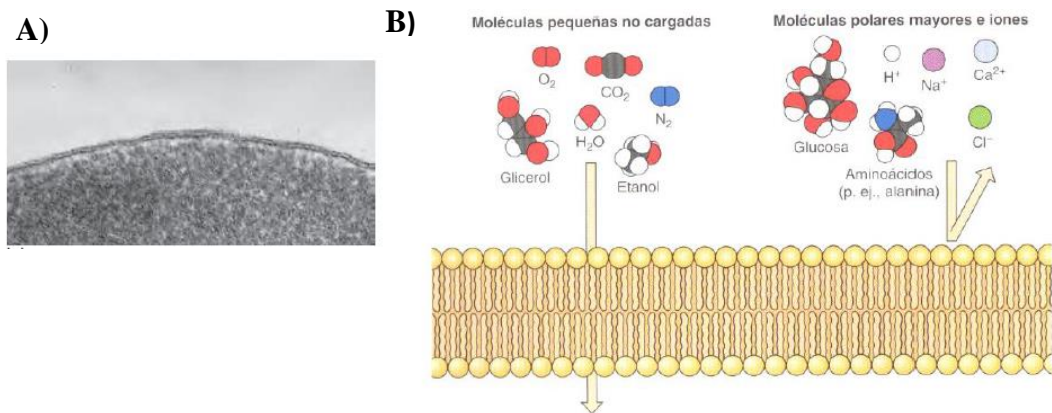


Figura 1. A) Micrografía electrónica de la bicapa lipídica de la membrana plasmática de una célula sanguínea humana. (Tomado de Alberts y cols., 2015) B) Esquema representativo de la membrana plasmática y su grado de permeabilidad hacia diferentes clases de moléculas. (Tomado de Cooper y cols., 2008)

Por lo descrito anteriormente, la presencia de proteínas transportadoras de membrana (transportadores y canales) es fundamental para que la célula pueda realizar muchas de sus funciones vitales, por ejemplo, los canales iónicos generan diferencias de concentraciones iónicas en ambos lados de la bicapa lipídica (Tabla 1), con lo que la membrana celular puede almacenar energía potencial en forma de gradientes electroquímicos, convirtiendo así estas señales electroquímicas en información vital para la célula (Alberts 2015).

Tabla 1. Comparación de concentraciones de iones inorgánicos dentro y fuera de una célula de mamífero.		
Componente	Concentración citoplasmática (mM)	Concentración extracelular (mM)
Cationes		
Na ⁺	5-15	145
K ⁺	140	5
Mg ²⁺	0.5	1-2
Ca ²⁺	10 ⁻⁴	1-2
H ⁺	7 × 10 ⁻⁵ (10 ^{-7.2} M o pH 7.2)	4 × 10 ⁻⁵ (10 ^{-7.4} M o pH 7.4)
Aniones		
Cl ⁻	5-15	110

(Modificado de Alberts y cols., 2015)

A diferencia de los transportadores o acarreadores, los canales interactúan con el soluto a transportar de manera débil, ya que gracias a la disposición de sus múltiples segmentos transmembranales, actúan como túneles estrechos formados por los mismos residuos de aminoácidos que conforman la proteína, permitiendo el flujo pasivo de agua, glicerol, amonio y pequeños iones inorgánicos cuando se abren a causa de un estímulo o señal extracelular.

Los canales iónicos por ejemplo, permiten el flujo de ciertos iones como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} o Cl^- en función de su tamaño, carga y esencialmente de su gradiente electroquímico, lo que los vuelve altamente selectivos a iones específicos cuyo paso está limitado por un filtro de selectividad, otras propiedades que los caracterizan es que se abren y cierran rápidamente, la tasa de flujo de moléculas superan casi 10 mil veces a la de los transportadores (cerca de 100 millones de iones por segundo), además de que su apertura está regulada por “puertas” que se abren en respuesta a estímulos específicos y se cierran después. Además de los estados abierto y cerrado que pueden presentar los canales iónicos, la mayoría pasa a un estado intermedio denominado estado inactivado, el cual sucede cuando un estímulo que abre el canal se ha prolongado por más tiempo provocando que los canales se desensibilicen a éste, por lo que ya no permiten el paso de iones y cuando el estímulo ha terminado regresan nuevamente al estado cerrado, es decir, se encuentran disponibles para abrirse ante un nuevo estímulo (Eisenberg, 1997; Cooper 2008; Alberts 2015).

De los diferentes tipos de estímulos que pueden generar la apertura de canales iónicos se encuentran los siguientes (Figura 2):

- a) Un cambio de voltaje a través de la membrana plasmática (canales iónicos dependientes de voltaje).
- b) Unión a un ligando (canales regulados por ligando) como unión a un neurotransmisor, la unión de un ión o a un nucleótido.
- c) Estrés mecánico (canales mecano-dependientes).

d) La fosforilación y defosforilación de algunas proteínas regula la actividad de algunos canales iónicos.

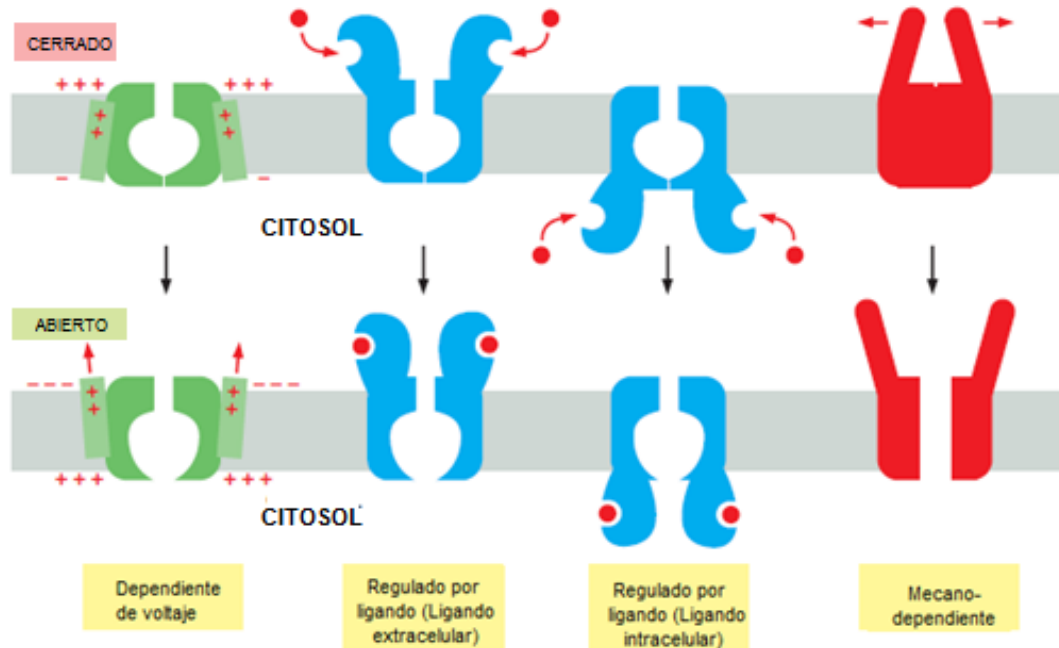


Figura 2. Esquema que representa los diferentes estímulos que pueden generar la apertura de los canales iónicos. (Modificado de Alberts y cols., 2015)

El primer dato sobre la existencia de los canales iónicos fue reportado por Bean y colaboradores, en cuyo trabajo se usó un material inductor de excitabilidad en bicapas no provenientes de músculo o nervio, lo que llevó a los científicos Erwin Neher y Bert Sakmann en 1976 a estudiar por vez primera canales unitarios en membranas biológicas usando pipetas de vidrio sobre músculo denervado para medir sus corrientes eléctricas, surgiendo así la técnica de “patch clamp”, la cual ha sido la técnica más usada para el estudio de canales iónicos (Bezanilla 1996). Gracias a esta y otras variaciones de tal técnica han sido identificados más de 100 tipos de canales, en los que se ha caracterizado el ion que conduce, el estímulo por el cual se activan y su abundancia y localización en los tipos celulares (Latorre 1996).

1.1 Canales iónicos dependientes de voltaje.

Los canales iónicos dependientes de voltaje, son proteínas integrales de membrana que funcionan como poros macromoleculares fundamentales para la generación y propagación de potenciales de acción en células excitables como neuronas, células de músculo cardíaco y esquelético al permitir el paso de moléculas cargadas como aniones y cationes cuando son activados en respuesta a un cambio del potencial de membrana o diferencia de voltaje de la membrana celular en el que estén expresados; los hay de varios tipos, su clasificación depende del ion al que son permeables principalmente, siendo los más importantes los canales de potasio, calcio, sodio y cloro aunque también pueden ser un poco permeables a otras moléculas cargadas como I^- , Mg^{2+} , H^+ entre otras (Ruben 2014; Hille 1992).

Estas proteínas fueron por primera vez descritas cuantitativamente en el axón gigante de calamar por los científicos Hodgkin y Huxley en 1952, quienes desarrollaron un modelo matemático que les condujo a describir la cinética de los canales así como predecir su comportamiento y participación en la generación y propagación de un potencial de acción, concluyendo acertadamente que la membrana se comporta como un circuito eléctrico y que al haber un flujo de iones a través de los canales es como se generan las corrientes iónicas. (Hodgkin y Huxley, 1952)

De estos tipos de canales se han encontrado muchas variantes o subtipos de cada uno, en especial de canales de potasio, por ejemplo, en el genoma humano se han identificado más de 90 genes que codifican para la principal subunidad del canal (subunidad α), cada una con una función y estructura específica (Tian et al, 2014). En cuanto a los canales de calcio, se han descrito diez familias proteicas en mamíferos, con diferentes papeles en la transducción de señales en la célula (Catterall, 2015) y en menor diversidad se encuentran los canales de sodio al estar conformados por una sola familia compuesta de 10 isoformas, esto en mamíferos, aunque recientemente se ha descubierto una segunda familia de este tipo (De Lera y Kraus, 2015).

Gracias a la aparición de la genética y biología molecular, se han podido clasificar estas proteínas analizando y comparando sus secuencias nucleotídicas y aminoacídicas, con lo que se determinó que todos estos grupos comparten similitudes, siendo homólogas estructural y funcionalmente aun cuando se expresan entre especies filogenéticamente distantes, con lo que se puede deducir que pertenecen a una misma súperfamilia proteica, las cuales pudieron evolucionar a partir de duplicación, mutación y/o selección de genes que codificaron para canales ancestrales comunes (Hille 1992; Stümer y Latorre 1996).

Con lo anteriormente expuesto, esta súperfamilia comparte las siguientes características:

- Están conformadas por una estructura en común (subunidad α) que consiste de 4 dominios repetidos (DI-DIV), cada uno con 6 segmentos transmembranales S1-S6 (Figura 3).
- Uno de esos segmentos (S4) está altamente conservado, compuesto por aminoácidos cargados positivamente arginina (R) o lisina (K), que funge como el sensor de voltaje y por tanto es el responsable de que el canal se active.
- Los aminoácidos que están entre los segmentos S5 y S6 de cada dominio forman el poro del canal.
- Tiene un filtro de selectividad iónica con el que los canales identifican los tipos de iones que podrán atravesarlos.
- Pueden estar asociadas o no a otras subunidades.

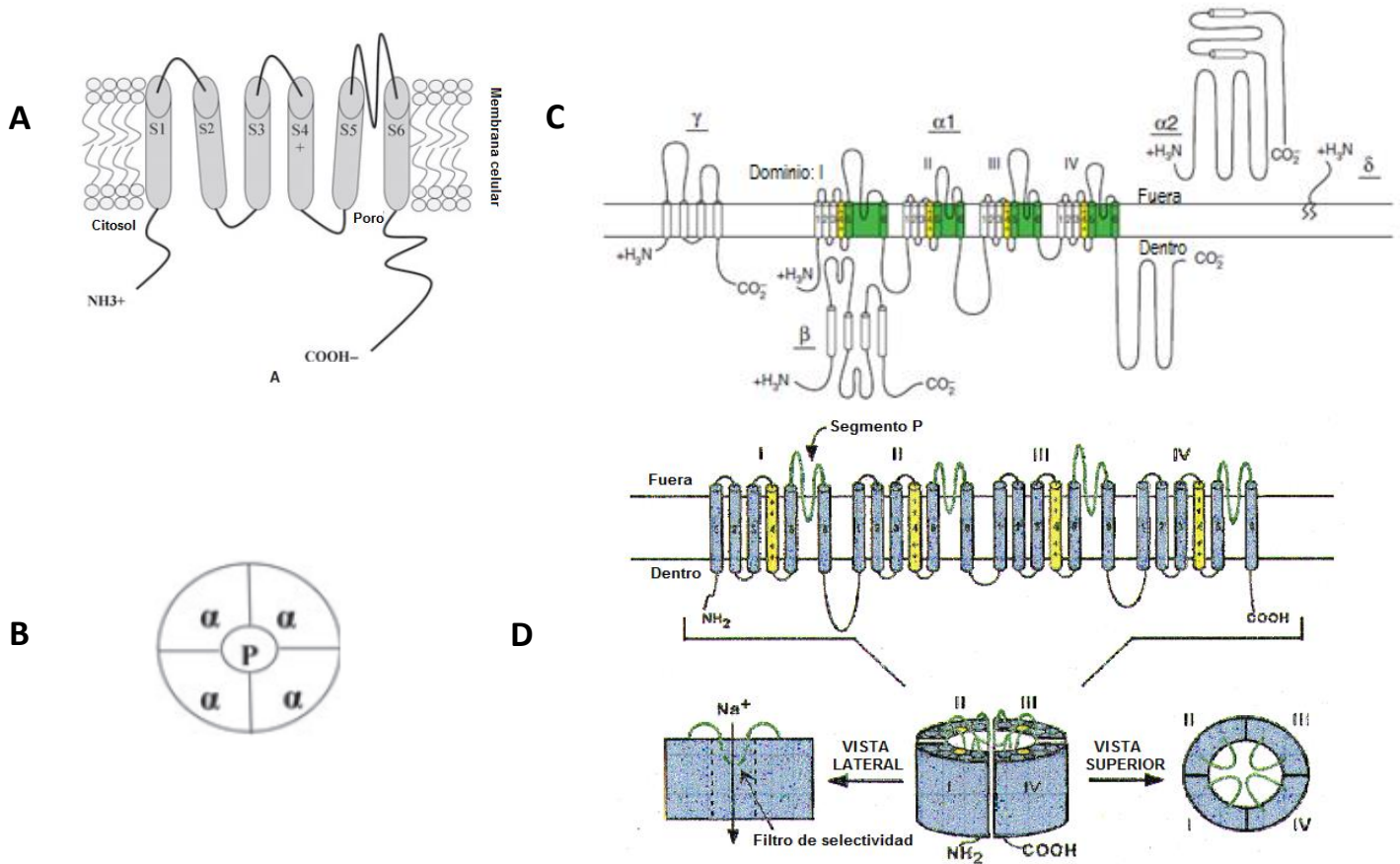


Figura 3. Esquemas que representan las estructuras de los diferentes grupos de canales dependientes de voltaje. **A)** Topología transmembrana de la subunidad α del canal de potasio K_v (Modificado de Tian et al, 2014) **B)** Estructura de la subunidad α del canal de calcio Ca_v y sus subunidades asociadas (Tomado de Catterall, 2015). **C)** Vista superior del ensamblaje tetramérico del canal de potasio K_v . **D)** Topología del canal de sodio Na_v (Modificado de Marban et al., 1998).

Las células excitables como, nerviosas, musculares o endócrinas, pueden sufrir una despolarización (cambio del potencial de membrana a un valor menos negativo) a causa de diferentes estímulos, una despolarización permite rápidamente la apertura de los canales de sodio dependientes de voltaje, los cuales abren paso hacia el espacio intracelular de una cantidad pequeña de iones sodio que se mueven gracias a su gradiente electroquímico, y como consecuencia de esto, la membrana se despolariza aún más generando una retroalimentación positiva al abrir más canales que provocan un mayor grado de despolarización de la membrana celular hasta que los valores del potencial de membrana y el potencial de equilibrio para el sodio se reestablecen. Estas proteínas al ser miembros de la súperfamilia de canales dependientes de voltaje (canales de Ca^{2+}

y K^+), forma un grupo importante que controla parte de la excitabilidad eléctrica de célula animales, siendo éstas responsables de la fase de despolarización del potencial de acción (Hille, 2001; Catterall, 2003; Yu y Catterall, 2004).

El movimiento de estas partículas cargadas que generan la corriente de sodio fue identificado primero por los científicos Hodgkin y Huxley en 1952 quienes describieron las tres principales características funcionales de los canales que son: la activación dependiente de voltaje, una inactivación rápida una conductancia iónica específica, pero fue hasta el año 1973 cuando se pudieron medir cuantitativamente estas corrientes por los científicos Armstrong y Bezanilla, combinando varias técnicas electrofisiológicas, también reportaron más características de las corrientes de sodio que sirvieron de pauta para estudiar el proceso de activación de estos canales (Catterall, 2000; Galimberti, 2012).

El estudio biofísico de los canales de sodio se realizó antes del descubrimiento de la estructura primaria de esta familia, ya que fue en los años 70's con el desarrollo de técnicas de biología molecular y nuevos métodos bioquímicos para el estudio de macromoléculas como es el caso de los canales iónicos, cuando se hicieron muchos estudios y análisis sobre la unión de los canales a otras moléculas, y con esto de cómo solubilizar y purificar las mismas, lo que permitió el descubrimiento de la proteína como tal en el año de 1980 por Beneski y Catterall mediante técnicas de marcaje por fotoafinidad y usando derivados de toxinas de escorpión.

Estudios posteriores condujeron a la obtención del ADNc de la proteína con su subsecuente secuenciación y así demostraron que el ARNm que codifica la subunidad alfa es suficiente para expresar canales funcionales (Noda et al., 1984; Catterall, 2000; Catterall, 2013).

1.2.1 Subunidad alfa

Una gran variedad de isoformas de la subunidad alfa del canal de sodio se han identificado, clonado, expresado funcionalmente y caracterizado gracias a todos los estudios y avances científicos como clonaje molecular, purificación bioquímica y registros electrofisiológicos primordialmente (Goldin, 2001); como se ha descrito, la primera proteína purificada en 1980 fue obtenida de tejido nervioso de mamífero, lo que permitió describir al canal de sodio como un complejo formado por una subunidad alfa de 260 kDa asociada a dos subunidades accesorias beta de 30-40 kDa (Beneski y Catterall, 1980; Hartshorne et al., 1982; Catterall, 2014), aunque ahora se sabe que no todas las isoformas están forzosamente asociadas a alguna subunidad accesoria para funcionar de manera nativa, como es el caso del canal de sodio cardíaco Nav1.5 al expresarse en miocitos.

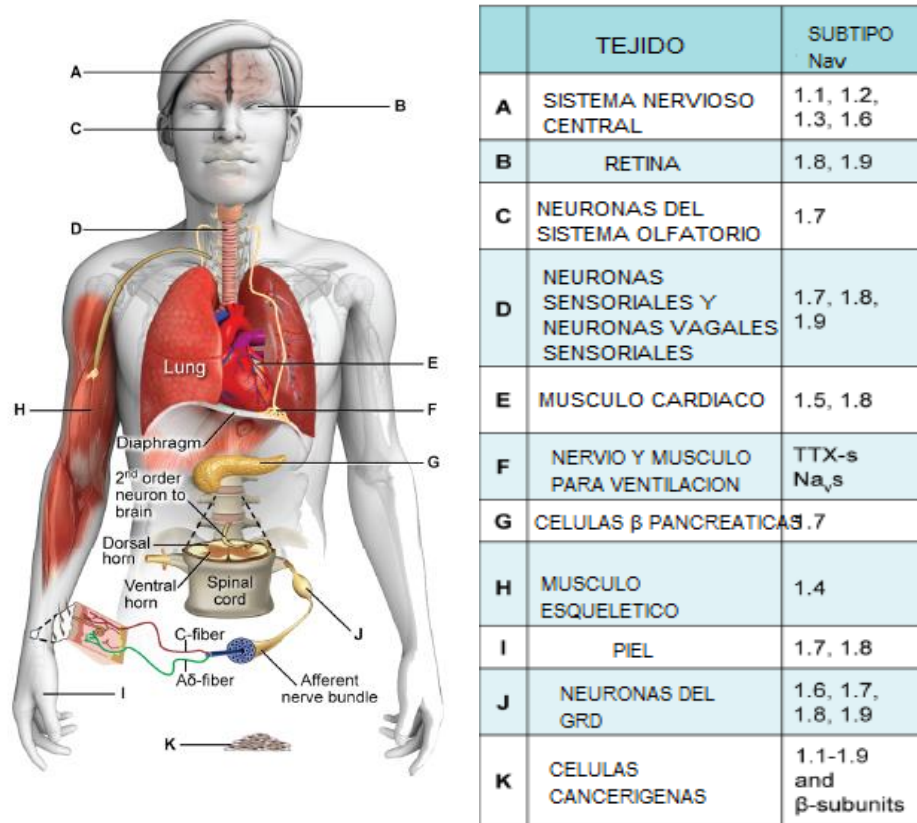


Figura 4. Expresión tisular de los diferentes subtipos de canales de sodio Nav. (Modificado de De Lera y Kraus, 2015).

Los genes que codifican a la subunidad alfa se han identificado y estudiado en diferentes especies, incluyendo mamíferos, vertebrados que no son mamíferos, invertebrados e incluso en células procariotas; a partir de los cuales se realizaron análisis filogenéticos que permitieron determinar que la expresión inicial de canales de sodio como tal fue en la medusa, pero que el canal pudo haber evolucionado a partir de los canales de calcio y que subsecuentemente evolucionó de manera independiente en vertebrados e invertebrados (Marban, 1998; Strong et al., 1993; Goldin, 2002). El mayor grupo de genes hasta la fecha estudiado es el de los canales expresados en células de mamífero, que representan una sola familia con diez miembros caracterizados (Tabla 2), los cuales en humanos se encuentran distribuidos en todo el cuerpo, si bien su estructura es homóloga cada isoforma tiene una función específica dependiendo del tejido donde se expresa incluyendo las células cancerígenas (Figura 4).

Tabla 2. Tipos de canales de sodio dependientes de voltaje, VGSC por sus siglas en inglés.

GEN	CROMOSOMA	CANAL	RESISTENCIA A TTX*
SCN1A	2q24,3	Nav1.1	+
SCN2A	2q24,3	Nav1.2	+
SCN3A	2q24,3	Nav1.3	+
SCN4A	11 (humano) 17q23,3 (ratón)	Nav1.4	+
SCN5A	3p21-24	Nav1.5	-
SCN8A	15 (humano) 12q13 (ratón)	Nav1.6	+
SCN9A	2q24	Nav1.7	+
SCN10A	3p22,2	Nav1.8	-
SCN11A	3p22,2	Nav1.9	-
SCN7A	2q24,2	Na _x	Desconocido

*TTX es la toxina aislada del pez globo a la que los canales pueden ser (+) sensibles o (-) resistentes (Modificado de Galimberti et al., 2012)

El análisis filogenético de las secuencias de los genes (SCN1A-SCN11A) reveló que estos canales comparten más del 50% de homología aminoacídica (Figura 5) y que aparecieron por duplicación genética y rearrreglos cromosomales de manera

relativamente reciente y evolutivamente hablando en comparación con los canales de Ca^{2+} y K^{+} (Catterall et al., 2005).

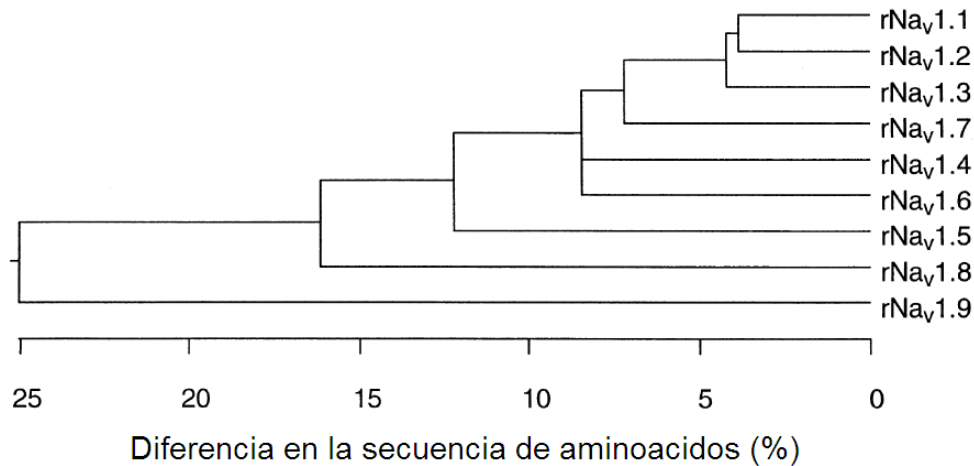


Figura 5. Las 9 isoformas del canal de sodio de mamífero que han sido identificadas y funcionalmente expresadas comparten un porcentaje mayor al 50% de similitud en su secuencia de aminoácidos de sus dominios extracelulares y transmembranales (Modificado de Catterall et al, 2005).

Las diez isoformas conforman la primera familia mejor caracterizada, designada con la nomenclatura que va de $\text{Nav}1.1$ a $\text{Nav}1.9$ y el canal Na_x , éste último no es dependiente de voltaje y juega un papel fundamental en el control de fluidos corporales y balances iónicos (Watanabe et al., 2000), el prefijo Nav indica el principal ion al que el canal es permeable y el principal regulador fisiológico (voltaje en este caso), el número que sigue indica la subfamilia del gen y el número después del punto identifica la isoforma específica, el cual fue asignado de acuerdo al orden de descubrimiento (Goldin et al., 2000).

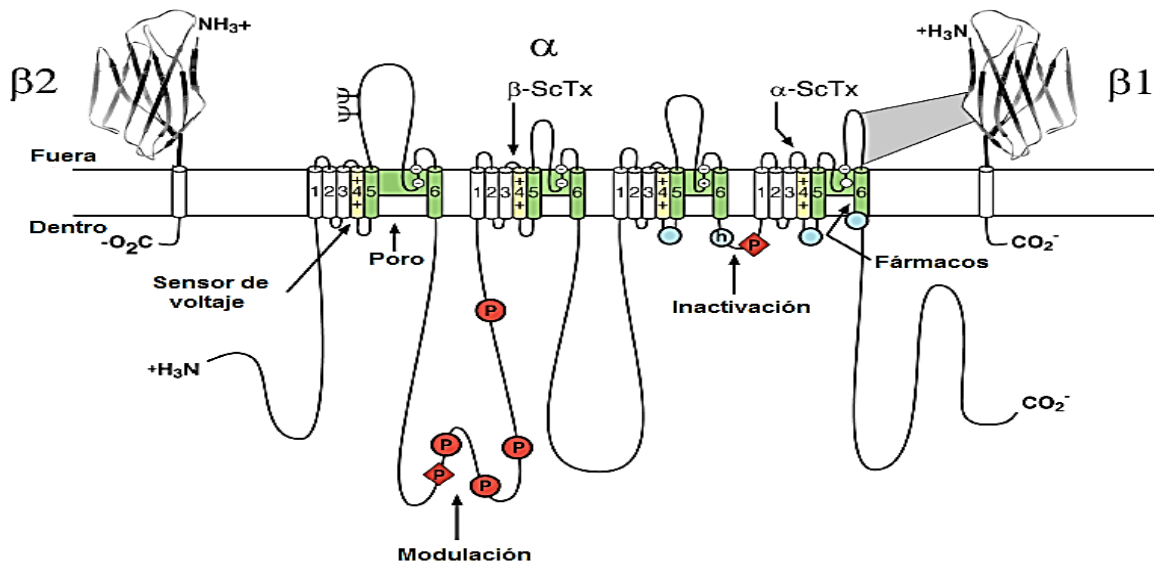


Figura 6. Estructura primaria del complejo proteico que forman al canal de sodio, donde los cilindros son los segmentos alfa hélices (SI-SVI); las asas intra y extra celulares son cadenas polipeptídicas; los dominios extracelulares de las subunidades beta son mostradas como estructuras tipo inmunoglobulinas; ψ marcan sitios de probable glicosilación; P en círculos rojos, sitios de fosforilación por PKA (círculos) y PKC (diamantes); verde, segmentos que forman el poro; círculos blanco, anillo externo (EEEE) e interno (DEKA) con aa que forman el filtro de selectividad y el sitio de unión a TTX; amarillo, sensor de voltaje S4; h en círculo azul, partícula de inactivación; círculos azules, sitios implicados en formar la compuerta de inactivación. (Modificado de Catterall et al, 2014).

La subunidad alfa de los canales de sodio está formada de alrededor 2 mil aminoácidos organizados en cuatro dominios homólogos (DI-DIV) con seis segmentos transmembranales (S1-S6) cada uno (Figura 6), estos dominios están arreglados de tal forma que rodean un poro central acuoso (Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003; Catterall, 2014).

1.2.2 Subunidades beta.

Está demostrado que la subunidad α forma un complejo con una o dos subunidades auxiliares β , desde la primera purificación de la isoforma expresada en cerebro junto con $\beta 1$ y $\beta 2$ (unidas a α de manera no covalente y por enlaces disulfuro respectivamente) se ha incrementado el interés por el estudio no sólo de la misma subunidad alfa, sino también de las subunidades beta, por otro lado, se han descubierto hasta el momento en el genoma de mamíferos, cuatro genes (SCNB1-SCNB4) que codifican cinco proteínas β ($\beta 1A$, $\beta 1B$, $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 4$) las cuales son transmembranales a excepción de $\beta 1B$ que es soluble, la expresión celular se muestra en la (**Tabla 3**); en humanos ya se conoce la localización de estos genes, así el gen de $\beta 1$ se localiza en el cromosoma 19q13 y $\beta 2$ junto con $\beta 3$ en el cromosoma 11q22-23 (Messner y Catterall, 1985; Yu y Catterall, 2003; Brackenbury, 2011).

Tabla 3. Expresión de subunidades β en SNC, SNP y corazón.

Tejido - Tipo celular	$\beta 1$	$\beta 1B$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$
Sistema nervioso central					
Neuronas hipocampales	+		+	+	+
Neuronas corticales		+	+	+	+
Ganlio basal	-		+	+	+
Células ganglionales de la retina	+		+		
Células de Purkinje cerebelares	+	+	+	+	+
Neuronas del gránulo cerebelar	+			-	
Núcleo cerebelar profundo		+	+		+
Neuronas del asta ventral		+	+		+
Astrociitos	+		+		
Glia de Bergmann	+	-	-	-	+
Glia radial	+				
Sistema nervioso periférico					
Ganlio de la raíz dorsal	+	+	+	+	+
Nervios periféricos		+	+	+	
Células de Schwann	+				
Corazón					
Miocitos ventriculares	+		+	+	+
Miocitos auriculares	+		+	+	+

Signo + denota expresión de la subunidad β o ARNm detectado; Signo - denota que la expresión de la subunidad β ni su ARNm han sido detectados. (Modificado de Palino e Isom, 2010).

Estas proteínas tienen un dominio extracelular (N-terminal), un dominio transmembranal y un dominio intracelular (C-terminal), se pueden expresar tanto en células excitables como en células no excitables, así como en presencia o en ausencia de la subunidad α , por tanto, la coexpresión con la subunidad beta es requerida para generar en algunas isoformas el comportamiento nativo del canal de sodio al modificar la cinética como la apertura y cierre del mismo, se sabe además que actúan como proteínas reguladoras al participar como moléculas de adhesión celular ya que pertenecen a la súperfamilia de inmunoglobulinas (CAMs), además pueden modular la expresión en la superficie celular de los canales (Patino e Isom, 2010; Savio et al., 2012).

1.2.3 Propiedades biofísicas.

1.2.3.1 Activación.

A partir de la obtención de las secuencias nucleotídicas de las diferentes isoformas de los canales de sodio y con su subsecuente análisis se pudo identificar un patrón repetido de codones que codifican para aminoácidos cargados positivamente como lisina y arginina (en mayor cantidad) en los segmentos S4 de cada dominio, siendo estos homólogos pero con número variable de aminoácidos como se muestra en la (Figura 7/Noda et al., 1964).

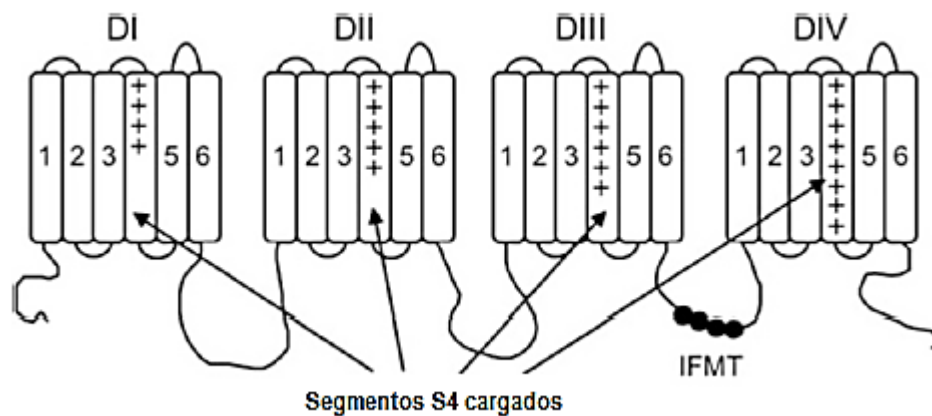


Figura 7. Estructura del canal de sodio mostrando la distribución asimétrica de las cargas positivas en los segmentos S4 de los dominio I a IV y la partícula de inactivación IFMT . (Tomado de Ruben y cols., 2014)

Los segmentos S4 se convirtieron en tema de gran interés al querer comprobar su participación en la cinética del canal como el sensor de voltaje cuando ocurre una despolarización de la membrana (teoría inicialmente predicha por Hodgkin y Huxley en 1952), promoviendo el “deslizamiento” de cada segmento S1-S4 hacia afuera a través de la membrana generando un cambio conformacional de la proteína que abre el poro, iniciando así la activación. Ahora se sabe que basta con el movimiento de los segmentos de los tres primeros dominios para que esto ocurra (Catterall, 1986; Guy y Seetharamulu, 1986; Galimberti, 2012; Ahern, 2015); por lo que estudios de mutagénesis fueron cruciales para dilucidar esta función.

En 1989 se obtuvo la primera evidencia que sustentaba esta hipótesis al realizarse mutaciones de los residuos de lisina y arginina, los cuales fueron cambiados a diferentes clases de residuos, ya fueran neutros o cargados negativamente, dilucidando así primeramente la importancia que existe entre los residuos de varía al momento de iniciar el proceso de activación y que además de iniciarla también dan apertura a la inactivación rápida correlacionada principalmente con el movimiento del segmento S4 del dominio IV (Stuhmer et al., 1989, Kontis et al., 1997).

1.2.3.2 Inactivación.

Un estado más de los canales de sodio aparte del abierto y cerrado es el inactivado, una conformación no conductiva que se da unos milisegundos después de la activación (Figura 8) y cuyo componente fue el primero funcionalmente identificado experimentalmente por Rohl et al., en 1999; el proceso de inactivación es requerido para el disparo repetitivo de potenciales de acción en circuitos neuronales y para un control de excitabilidad muscular y neuronal, se sabe además que incluye a la inactivación rápida, inactivación lenta e inactivación ultra lenta y puede ser modulado por la interacción con las subunidades beta, esto

dependiendo de la isoforma alfa así como de la beta, por ejemplo, la subunidad beta 1 acelera la recuperación de la inactivación de Nav1.5.

Al inicio de su descubrimiento se pensaba que su componente principal se unía a la boca intracelular del poro actuando como una bola que ocluía el paso de los iones, así se dio la teoría de la “bola y la cadena”. Se identificó que esa bola es en sí un conjunto de aminoácidos que forman parte de un asa intracelular altamente conservada que conecta a los dominios III y IV, éstos residuos forman el motivo IFMT (Isoleucina, Fenilalanina, Metionina y Treonina) como se ve en la figura 7, los cuales en diversos trabajos han sido mutados o sustituidos para probar dicha función, además de obtener su estructura tridimensional para comprender la manera en que se mueven y posicionan para unirse a su receptor de inactivación (Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003; Galimberti et al., 2012).

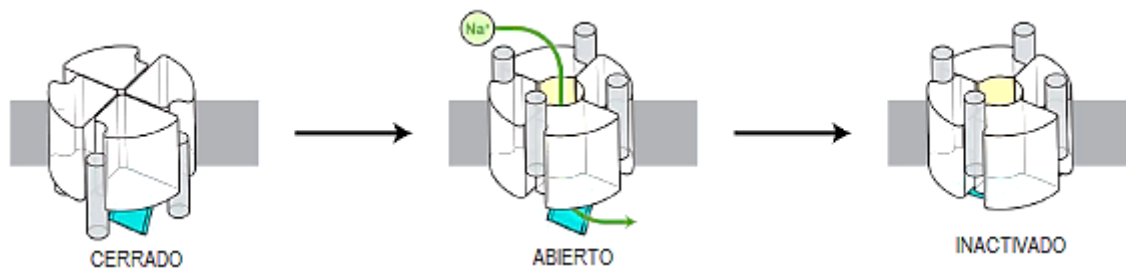


Figura 8. Representación esquemática de los diferentes estados de los canales de sodio dependientes de voltaje Nav de mamíferos basada en el modelo de inactivación acoplada. (Modificado de Ahern y cols., 2015)

1.3 Efecto de anestésicos locales sobre el canal de sodio.

Se ha demostrado que la subunidad alfa de los canales de sodio es blanco de una gran diversidad de toxinas, péptidos y fármacos que afectan o modulan su comportamiento, principalmente bloqueando el paso de corriente iónica. Los sitios de unión en los canales (expresados en humano) de todas éstas moléculas se han identificado a través de estudios de mutagénesis, biofísicos y de farmacología principalmente, tales sitios se representan en la figura 9 (Marban et al., 1998; Catterall, 2000).

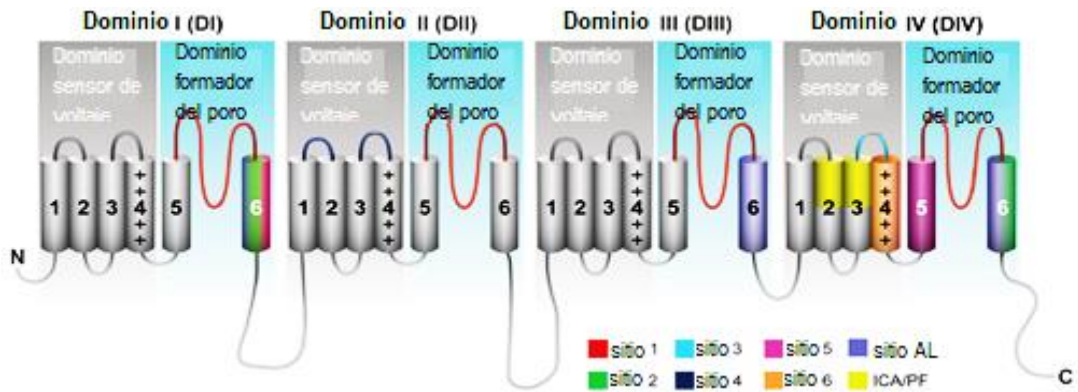


Figura 9. Topología de la subunidad alfa del canal de sodio indicando 8 sitios de unión de las moléculas que bloquean su conductancia, donde los sitios del 1 al 6 marcan los sitios de unión a neurotoxinas, en púrpura se marca el receptor para anestésicos locales. (Modificado de De Lera y Kraus, 2015)

1.3.1 Anestésicos locales.

Los canales de sodio son blanco de una gama de fármacos como son los anestésicos locales (AL) ya que suprimen de una forma localizada y reversible el proceso de excitación-conducción de las membranas de células excitables por lo que sus efectos se manifiestan sobre la mayoría de éstas, es decir, pueden actuar sobre cualquier estructura de la neurona, en cualquier grupo neuronal y afectar incluso membranas no neuronales como miocardio y músculo (Goodman y Gilman, 2007), por esta razón, han sido utilizados en la clínica por décadas ya sea como analgésicos bloqueando la señalización relacionada al dolor, así como en el tratamiento de varias enfermedades provocadas por diversas canalopatías como es el caso de arritmias cardíacas o epilepsias, por mencionar algunas (Figura 10).

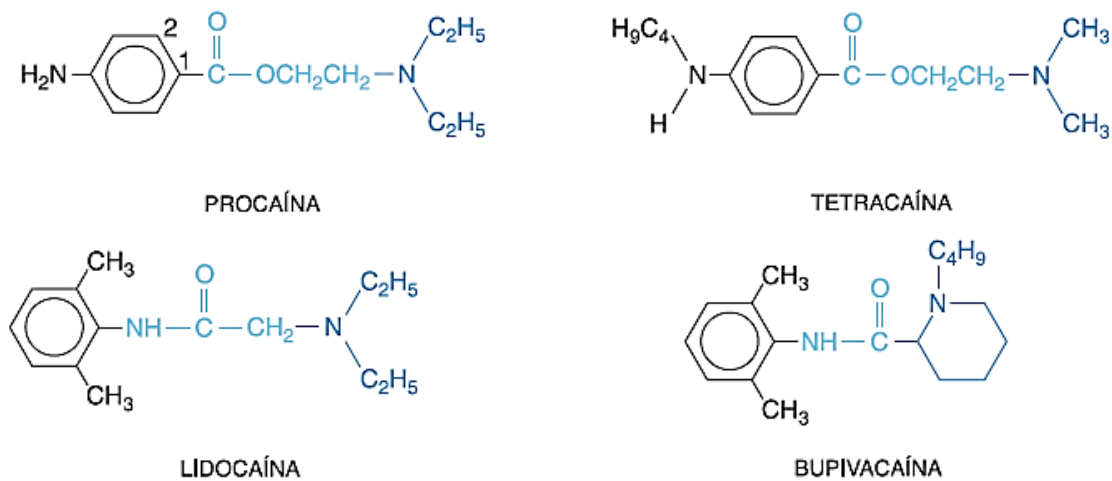


Figura 10. Estructuras químicas de los anestésicos locales más usados en la clínica y experimentalmente. Contienen dos fracciones, una hidrófila y otra hidrófoba separadas por una ligadura de éster o amida intermedia, el grupo hidrófilo puede ser una amina terciaria o una amina secundaria; la porción hidrófoba debe ser una mitad aromática. La naturaleza del grupo de enlace determina algunas de las propiedades farmacológicas de estos agentes. (Tomado de Goodman y Gilman, 2007)

Su mecanismo de acción es bloquear las corrientes iónicas cuando se unen a sitios de interacción específicos localizados en la cavidad interna del poro del canal; con estudios de mutagénesis se encontró que el receptor para AL está formado por aminoácidos situados en los segmentos S6 de los dominios I, III y IV como fueron modelados en la (Figura 11) (Ragsdale et al., 1994; Catterall, 2000, Yarov-Yarovoy et al., 2002). Siendo el aminoácido Fenilalanina en el S6DIV el de mayor importancia, ya que al mutarlo por un aminoácido no aromático elimina el bloqueo dependiente de uso (Ahern et al., 2008). Antes de servir en la clínica, dichos bloqueadores han funcionado de herramientas biofísicas para complementar el estudio y entendimiento de la cinética de los canales iónicos.

De igual forma se ha encontrado que los AL exhiben varios mecanismos de bloqueo en los diferentes estados conformacionales del complejo proteico, así cuando el canal se abre, es cuando el AL ocupa su sitio con mayor afinidad de manera dependiente de uso, aunque también se une fuertemente en el estado inactivado del canal; en cuanto a potenciales hiperpolarizantes se sabe que estos compuestos bloquean el canal en su estado cerrado aunque con menos afinidad por una vía de acceso hidrofóbico (Payandeh et al., 2011).

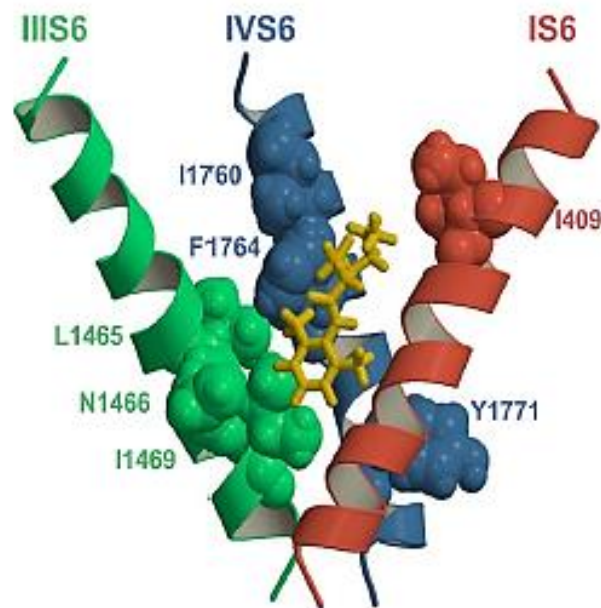


Figura 11. Modelo *in silico* que muestra el receptor para AL en el canal de sodio Na_v1.2 de mamífero. (Yarov-Yarovoy et al., 2002)

1.4 Canal de sodio dependiente de voltaje hNav1.5

El canal de sodio Nav1.5 es una de las isoformas más estudiadas de la familia proteica a la que pertenece, la cual en mamíferos se expresa principalmente en músculo cardiaco; el gen que la codifica es denominado SCN5A (GenBank: M77235) fue por primera vez clonado, secuenciado y funcionalmente expresado en el año 1991 (Gellens et al., 1992).

Mutaciones en su secuencia de ADN puede afectar la cinética normal del canal. Dependiendo de la mutación y del sitio específico donde se expresa la proteína mutada, puede dar origen a una variedad de canalopatías que se traducen en arritmias cardiacas principalmente (**Figura 12**) ya que esta proteína es la responsable de la iniciación y propagación del potencial de acción cardiaco (Balsler, 2001).

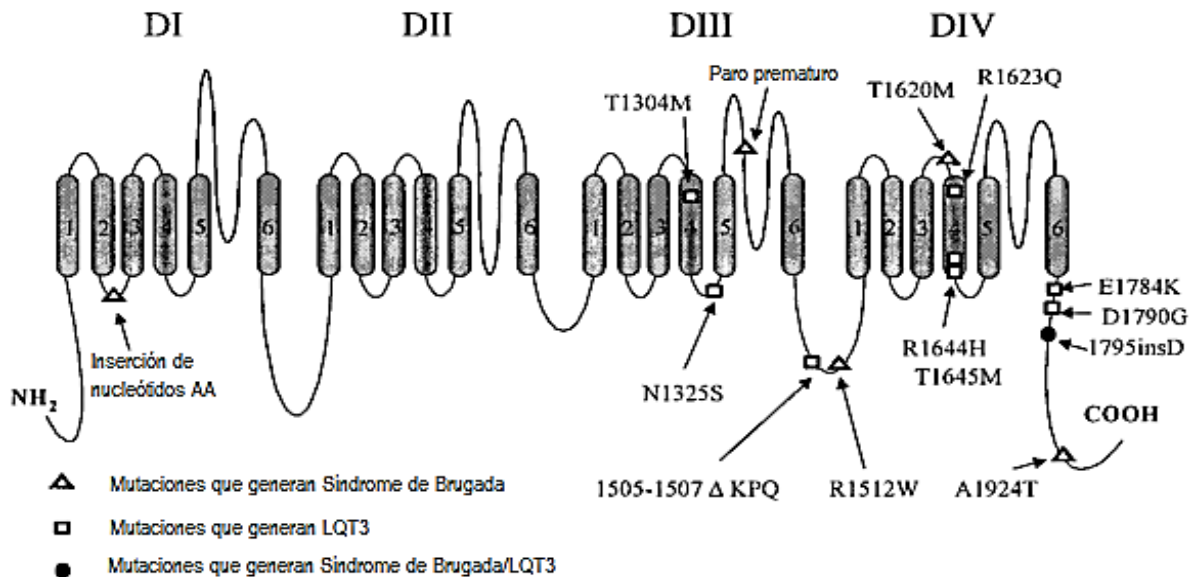


Figura 12. Mutaciones inherentes del canal de sodio cardiaco. Topología del canal de sodio en humano donde se marcan las mutaciones puntuales ligadas al Síndrome del QT largo y al Síndrome de Brugada. (Modificado de Balsler, 2001)

1.5 Antecedentes específicos.

En el laboratorio de Biofísica Cardíaca se ha estudiado el efecto electrofisiológico del fármaco JNJ7777120 (antihistamínico específico del receptor de histamina H4, que también posee propiedades antihiperálgicas y antinociceptivas,) sobre el canal rNav1.4 nativo, ya que sus efectos podrían ser consecuencia del bloqueo de canales de sodio voltaje dependientes, por lo tanto, además de investigar su acción sobre el canal nativo, se requirió la generación de la proteína mutada en el principal aminoácido del sitio de unión a AL, rNav1.4/F1579A (Sánchez, 2015) y que al comparar el efecto del fármaco sobre ambas proteínas, la nativa y la mutada, se obtuvieron datos aún no publicados que demuestran que dicho fármaco induce un tipo de bloqueo en canal de sodio Nav1.4 mediado por la Fenilalanina 1579 del sitio de unión a AL.

Sin embargo, los datos biofísicos resultantes demuestran que aunque el fármaco en estudio tiene características químicas y estructuralmente similares a los AL, no se comporta como tal, ya que no tiene efectos significativos sobre el canal en su estado inactivado (Juárez, 2017), a diferencia de los AL que tienen mayor efecto sobre dicho estado del canal.

2 Planteamiento del problema

Se ha demostrado por medio de técnicas de mutagénesis la importancia de diversos aminoácidos para el correcto funcionamiento de los canales de sodio dependientes de voltaje, ya que al deletar, insertar o simplemente realizar una mutación puntual de uno o varios aminoácidos conservados de la secuencia de ADN de esta familia proteica, se puede evidenciar la participación del aminoácido en el funcionamiento del canal, lo que permite hacer modelos moleculares para comprender mejor la biofísica y estructura de estas proteínas complejas. Además de que en los últimos años ha incrementado el interés por desarrollar bloqueadores con alta especificidad por algunas isoformas de los Na_v , por ejemplo teniendo como objetivo la corriente tardía del canal $Na_v1.5$ donde tales bloqueadores pueden ser usados como tratamiento a enfermedades cardiacas como arritmias, isquemia cardiaca y falla cardiaca, por lo que la caracterización de múltiples sitios de unión de diferentes moléculas o drogas es uno de los puntos más importantes para el desarrollo de fármacos y predecir sus respuestas biológicas a algún tratamiento (Balsler, 2001; Fozzard et al., 2011; O'Reilly et al., 2012).

En el laboratorio de Biofísica Cardiaca ya se están investigando los efectos electrofisiológicos de fármacos sobre la cinética de algunos canales de sodio dependientes de voltaje, como es el caso del fármaco JNJ7777120 descrito en el apartado [\[1.5\]](#). Sin embargo, aún falta más por investigar de este compuesto para mejorar su caracterización (con base a los resultados ya obtenidos en el canal $Na_v1.4$), por lo que se requiere estudiar sus efectos sobre otras isoformas nativas y mutadas en el sitio de unión a AL, generando así la necesidad de contar con la isoforma $hNa_v1.5/F1760A$, que puede ser utilizada en el laboratorio para estudiar y analizar los efectos de este y otros agentes químicos poco estudiados.

3 Objetivos

3.1 Objetivo General

Realizar la mutación F1760A en la secuencia codificante para el canal de sodio cardiaco humano (hH1) clonado en el plásmido pSP64T.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar un análisis bioinformático simple para localizar la posición del codón a mutar en la secuencia codificante del gen que codifica el canal Na_v1.5.
- Diseñar un par de oligonucleótidos mutagénicos con las características ideales para obtener dicha mutación.
- Realizar una PCR en gradiente para obtener la T_m óptima de hibridación de los oligonucleótidos.
- Introducir la mutación F1760A en el canal hH1 clonado en el vector pSP64T mediante PCR de punto final.
- Eliminar el plásmido parental mediante digestión con la enzima *DpnI* y transformar bacterias competentes con el plásmido mutado.
- Amplificar el plásmido con la correspondiente mutación, purificarlo y obtener su mapa de restricción.
- Secuenciar un segmento de aproximadamente 600 pb para corroborar el cambio del aminoácido Fenilalanina por Alanina mediante un alineamiento con el canal nativo.

4 Material y Métodos

4.1 Comprobación de la integridad del plásmido a usar.

4.1.1 Digestión enzimática.

Antes de comenzar con la mutagénesis, se verificó el patrón de restricción del plásmido pSP64T/hNav1.5 (**Figura 13**), que con el inserto del gen, en sitio de clonación múltiple, que codifica para el canal Nav1.5, tiene un tamaño final de 11,300 pb, sumando los tamaños de los fragmentos que se generan al cortar los sitios, marcados en la figura, con la enzima BamHI. Se realizó una digestión enzimática del plásmido, que se llevó a cabo de la siguiente manera: se tomó 1.7 μ l (1 μ g de ADN plasmídico) del vial control y se mezcló con 2 μ L de buffer 10x, 1 u de la enzima de restricción BamHI* y 15.3 μ L de agua estéril para ajustar a un volumen final de 20 μ L. La reacción se incubó por 1 hora y media en un baño a una temperatura de 37 °C.

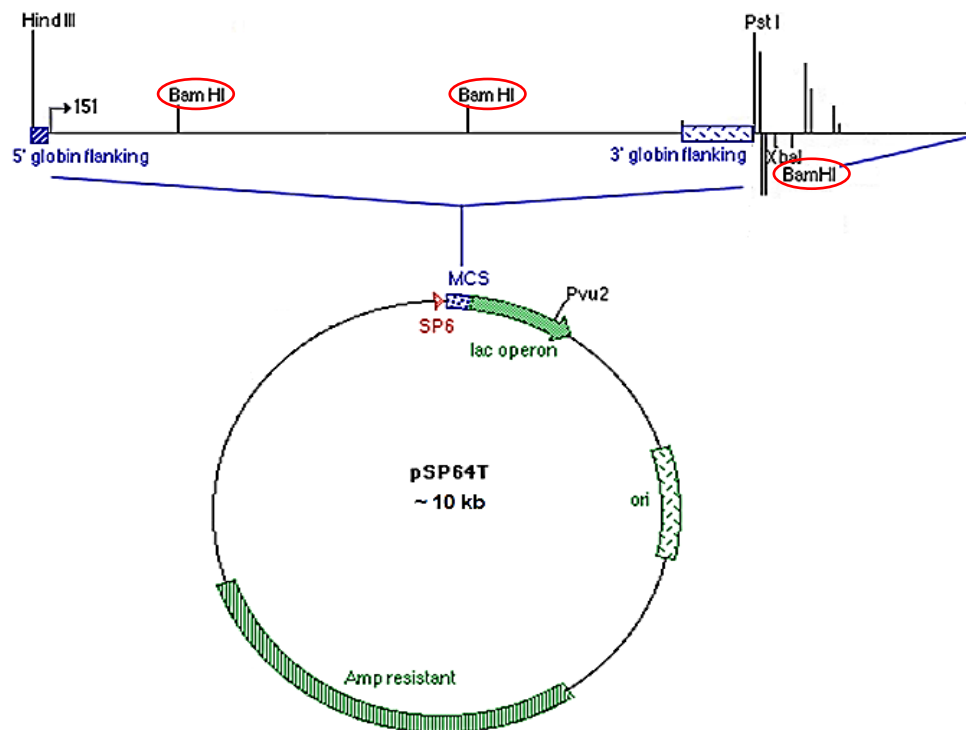


Figura 13. Representación esquemática de la construcción del vector pSP64T/hNav1.5 [PMID: 62077484] Se muestran las diferentes secuencias necesarias para fungir como vector de expresión y clonación. MCS: sitio de clonación múltiple, donde se localiza el fragmento que corresponde al promotor SP6 y enseguida las regiones 5' y 3' que flanquean el gen de la beta globulina de la rana *Xenopus laevis* (Krieg et al., 1984)

*1 u de BamHI: Una unidad de enzima es la que se necesita para cortar 1 μ g de ADN en 1 hora.

4.1.2 Electroforesis.

Mapa de restricción.

Se obtuvo un patrón de ADN generado por el corte del plásmido circular la enzima de restricción BamHI, la cual realiza 4 cortes en el plásmido pSP64T/hH1, generando 4 bandas de los siguientes pesos moleculares: 6000, 2000, 1800 y 1500 pb, las cuales se visualizaron mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 %. Poniendo como control el plásmido sin cortar.

El gel se preparó pesando 0.36 g de agarosa, la cual se disolvió en 45 mL de TBE 0.5X, calentando suavemente en un horno de microondas hasta que no quedaron grumos; se dejó entibiar y se agregaron 1.2 μ L de bromuro de etidio, se mezcló muy bien y se vertió en una charola de electroforesis, colocando un peine para que se formaran los pozos.

A cada muestra se le agregó 3 μ L de buffer de carga y agua destilada estéril para ajustar el volumen a 12 μ L. En el primer pozo se colocó el ADN sin digerir (1 μ g), en el segundo, el marcador de peso molecular (1 kb PROMEGA) y en el tercero el ADN digerido. El gel se corrió en una cámara de electroforesis horizontal a 100 volts durante 1.5 horas, las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz UV y se tomó una fotografía para su documentación.

4.2 Diseño de oligonucleótidos mutagénicos.

Las características que deben cumplir los oligonucleótidos mutagénicos son las siguientes:

- Ambos oligonucleótidos deben contener la mutación deseada y deben alinearse a la misma secuencia de las cadenas complementarias del plásmido.

- Deben tener un tamaño de entre 25 y 45 nucleótidos, con un promedio de 10 a 20 bases a cada lado de la secuencia de interés a mutar.
- Una Tm mayor a 60° C.
- Contenido óptimo de GC de 40 a 50 %.
- Es recomendable que el oligo termine en una o dos bases de C (citocinas) y/o G (guaninas).
- Que los oligonucleótidos no formen heterodímeros ni homodímeros.
- Que las temperaturas a las que puedan formar estructuras secundarias estén lejos de las temperaturas que se alcanzarán en el termociclador.

Para realizar el diseño se utilizó de plantilla la secuencia nucleotídica nativa del canal, obtenida en formato FASTA del banco de datos NCBI con el número de acceso M77235 y posteriormente se tradujo a sus respectivos aminoácidos mediante el programa *Codon plot*, para localizar la posición del codón que se traduce en fenilalanina (F1760), que es el aminoácido de interés. Se realizaron varios diseños que se evaluaron en el programa *oligo analyzer* de la página de *INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES* para optar por el par con las mejores características.

4.3 Mutagénesis sitio dirigida.

Para la obtención del ADN mutado, se llevó a cabo la técnica de mutagénesis sitio dirigido, la cual comprende tres etapas (Figura 14).

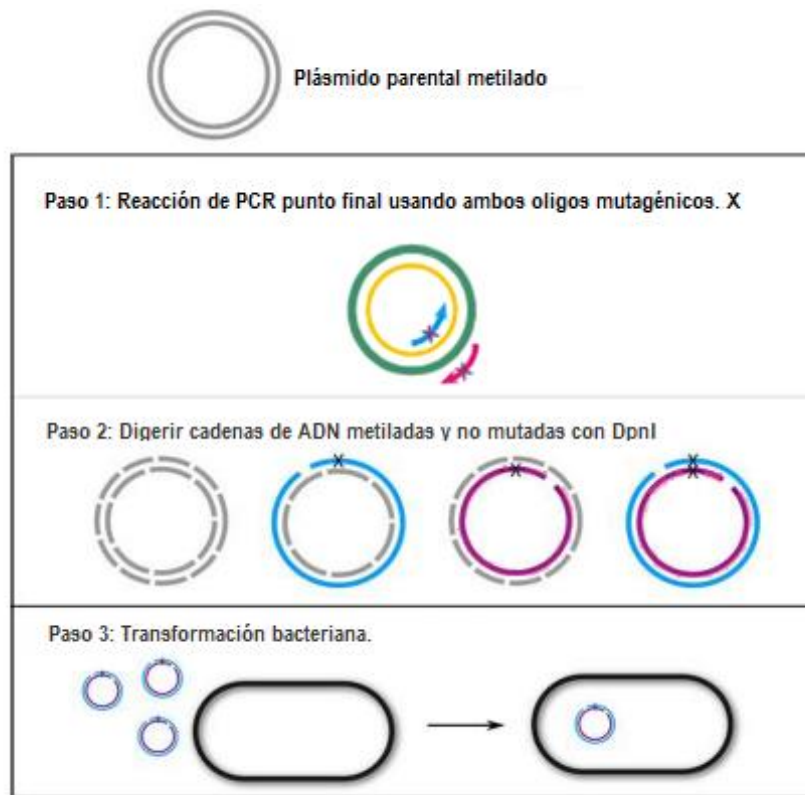


Figura 14. Representación esquemática de la técnica de mutagénesis sitio dirigida. (Modificado de Edelheit et al., 2009)

4.3.1 PCR en gradiente de temperaturas.

Para determinar la mejor temperatura de hibridación de los oligonucleótidos mutagénicos, antes de llevar a cabo la mutagénesis, se realizó una PCR en gradiente (Tabla 4 y 5) utilizando en un caso A, el oligo mutagénico sentido y el oligo de secuenciación antisentido y en el otro caso B, el oligo de secuenciación sentido y el oligo mutagénico antisentido. Los amplicones de aproximadamente 350 pb se visualizaron en un gel de agarosa al 1%.

Tabla 4: Composición de las mezclas para la PCR en gradiente.

REACTIVO	Tubos A		Tubos B	
	µl	Conc.	µl	Conc.
Mix Dream Taq	12.5		12.5	
Plantilla ADN	1	50 ng	1	50 ng
Oligo mutagénico Fw	1	194 ng	—	—
Oligo secuenciación Rv	3	210 ng	—	—
Oligo mutagénico Rv	—	—	1	209 ng
Oligo secuenciación Fw	—	—	2.3	196 ng
Agua	8.2		7.5	

Vol. Final	25	25
-------------------	----	----

Tabla 5: Condiciones de la PCR en gradiente.

Etapa	°C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	1 min	1
Desnaturalización	95	1 min	30
Alineamiento	57, 58, 59, 60 y 62	1 min	
Extensión	72	30 s	
Extensión final	72	10 min	1

4.3.2 PCR punto final

La cantidad de reactivos así como los parámetros usados en el termociclador fueron establecidos a partir de las especificaciones de la polimerasa utilizada; para este trabajo se usó una *Phusion Green High-fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific).

Tabla 6: Composición de la mezcla para la PCR punto final.

REACTIVO	µl	Conc.
5X Phusion Green HF Buffer	12.5	
dNTP's	1	200 µM
Oligo mutagénico Fw	1	10 µM
Oligo mutagénico Rv	1	10 µM
ADN molde	1	50 ng
MgCl₂	0.5	1 mM
Agua estéril	34.5	
Polimerasa	1	2 U
Vol. Final	50	

Tabla 7: Condiciones de la PCR punto final.

Etapas	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	98 °C	1 minuto
Desnaturalización	18	98 °C	1 minuto
Alineamiento		60 °C	1 minuto
Extensión		72 °C	6 minutos
Extensión final	1	72 °C	10 minutos

NOTA: Los parámetros del ciclo térmico para la amplificación varían de acuerdo al diseño de los oligonucleótidos. Se puede realizar un previo calentamiento de los oligonucleótidos y de la plantilla por 10 min a 70 °C, esto para eliminar cualquier estructura secundaria que se pueda estar formando. Para este caso no se realizó la desnaturalización previa ya que los 98 °C en la desnaturalización inicial debieron ser suficientes para desnaturalizar completamente el ADN.

4.3.2.1 Digestión con *DpnI*

Después de la PCR se hizo una digestión con la enzima *DpnI** (Fermentas) para eliminar las cadenas parentales metiladas, esto para obtener únicamente el plásmido no metilado.

**DpnI*: enzima de restricción que corta en la secuencia GATC sólo si está metilada la adenina (Gm6ATC) por la enzima Dam metilasa; para asegurar la completa eliminación de la cadena molde, la reacción se dividió en dos tubos, y a cada uno se le agregó 1 u de *DpnI* y 2 µL de buffer. Las muestras se incubaron a 37 °C por 1 h, tiempo suficiente para completar la digestión total de la cadena.

4.3.2.2 Visualización del producto de PCR en gel de agarosa.

Antes de realizar la transformación bacteriana se corrió el producto de PCR en un gel de agarosa al 0.8 % para ver si se generó el amplicón del tamaño esperado, donde de manera cualitativa se determinó su concentración y se verificó que se haya eliminado completamente la plantilla (es necesario aclarar que en el gel se puede o no visualizar amplicón ya que de ser una cantidad muy pequeña, la banda apenas podría ser perceptible).

El gel se preparó pesando 0.24 g de agarosa en 30 mL de TBE 0.5X, y se procedió como en el apartado [\[6.1.2\]](#). Las muestras se mezclaron con 3 μ L de buffer de carga y agua destilada estéril para ajustar el volumen a 12 μ L. En el primer pozo se cargó el ADN control (100 ng) y en el segundo 5 μ L de la reacción de PCR sólo con buffer de carga. El gel se corrió a 100 volts por 30 minutos y se reveló en un transiluminador de luz UV.

4.3.3 Preparación de bacterias competentes y transformación.

Para obtener las células competentes se realizó un precultivo de 2 mL de la cepa *E. coli* OneShot Top 10 (bacterias que tienen el perfil filogenético adecuado para obtener una eficaz y rápida transformación), el cual se dejó incubar en agitación (180 rpm) aproximadamente de 14-16 h, a 37 °C; posteriormente se inocularon 60 μ L de este precultivo en 25 mL de medio LB estéril y se incubó a 37 °C en agitación; se monitoreó la concentración del cultivo cada 15-20 min hasta que alcanzó una absorbancia de 0.38 a una longitud de onda de 600 nm.

Se transfirió el cultivo a 2 tubos de centrifuga estériles; se enfriaron a 0 °C colocándolos en hielo por 10 min; se centrifugaron a 5000 rpm por 10 min a 4 °C; pasado el tiempo se decantó el sobrenadante y se colocaron los tubos sobre un papel en posición vertical por 1 min para eliminar completamente el líquido; las pastillas se resuspendieron en 15 mL de una solución de MgCl₂-CaCl₂ frío (80 mM

y 20 mM respectivamente) y se centrifugaron a 5000 rpm a 4 °C por 10 min; nuevamente se decantó el sobrenadante y finalmente se resuspendieron ambas pastillas en 1 mL de solución CaCl₂ 0.2 M.

Para la transformación bacteriana se adicionaron 200 µL de bacterias competentes frescas en 3 tubos eppendorf de 1.5 mL, a cada tubo se le adicionó lo siguiente:

1.- Control positivo, 40 ng de ADN nativo; 2.- Control negativo, nada; 3.- Muestra, 40 µL de la reacción de PCR. Se mezclaron y se incubaron en hielo por 30 min; pasado el tiempo se dio un choque térmico, incubando las muestras en un baño a 42 °C por 90 s cuidando que la temperatura se mantuviera estable y rápidamente se transfirieron a hielo por 2 min; se adicionaron 800 µL de medio LB en cada tubo (se mezcló suavemente), y se incubaron a 37 °C por 45 min en agitación; los tubos se centrifugaron a 5000 rpm por 5 min y cada pastilla se resuspendió en 100 µL de medio LB; se inocularon en placas de agar LB con *Ampicilina* [120 µg/mL] y se incubaron a 37 °C por 18 horas, después de ese tiempo, se sacaron las placas y se revisó el resultado de cada una y se fotodocumentó.

4.4 Mini preparación de ADN plasmídico por ebullición.

Se hicieron cultivos de 2 mL de medio LB con ampicilina, los cuales se inocularon con cada una de las colonias resultantes de la placa con la reacción de mutagénesis, se centrifugó 1 mL de cada cultivo en un tubo eppendorf de 1.5 mL a 6000 rpm por 6 min y se eliminó el sobrenadante; las pastillas se resuspendieron en 1 mL de medio LB estéril, se centrifugaron nuevamente a 6000 rpm por 6 min y se eliminó el sobrenadante; se agregaron 600 µL de solución STET (4% Sacarosa, 5% Triton 100X, 50 mM EDTA y 50 mM Tris-HCl pH 7.4) a cada tubo y se resuspendieron las pastillas, enseguida se adicionó la lisozima [10 mg/mL] (preparada previamente) y se homogenizaron las muestras; los tubos se pusieron a ebullición en baño a 98 °C por 1 min, posterior a eso se centrifugaron por 10 min a

13 mil rpm a temperatura ambiente; se eliminó la pastilla de cada tubo con un palillo de dientes y se adicionaron 650 μ L de isopropanol para precipitar el ADN plasmídico, se dejaron reposar 5 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 13000 rpm por 6 min; se eliminó el sobrenadante y se enjuagó la pastilla de cada tubo con etanol al 70 %, se centrifugaron por última vez a 13000 rpm por 6 min y finalmente se resuspendieron las pastillas en 50 μ L de buffer TE pH 8.

Se obtuvo la concentración de cada purificado para el siguiente protocolo, por lo que se realizó una dilución en tubos eppendorf de 1.5 mL, agregando 10 μ L de ADN plasmídico en 990 μ L de agua estéril para medir en el espectrofotómetro sus absorbancias a 260 y 280 nm.

Aplicando la siguiente formula, se obtuvo la concentración de plásmido en cada tubo:

$$\text{DNA (ng}/\mu\text{L)} = \frac{(\text{fact.dilución})(\text{Abs.260nm})(50)}{1000}$$

Donde:

$$\text{*Factor de dilución} = \frac{\text{Volumen total}}{\text{Volumen de la muestra}}$$

*50 es el factor de conversión para ADN

*1000 es el factor de conversión a ng

4.4.1 Restricción con enzima BamHI.

Como prueba preliminar para la comprobación de que el plásmido extraído de las colonias transformantes era el pSP64T, se sometió cada mini prep a una digestión enzimática con BamHI, para esto se tomaron 1000 ng de cada una y se mezclaron con 1 μ L de la enzima de restricción, 2 μ L de su buffer y x μ L de agua estéril en un volumen final de 20 μ L en tubos eppendorf de 0.6 mL, los cuales más un control se dejaron incubar a baño maría por un tiempo de 1 hora 30 minutos a una

temperatura de 37°C y las muestras se corrieron en un gel de agarosa de 45 mL al 0.8% para visualizar el patrón de restricción mencionado en el apartado [\[4.1\]](#).

4.5 Purificación pSP64t/Hh1 mutado.

4.5.1 Amplificación de bacterias transformadas.

De los cultivos que visualmente contenían el plásmido se eligió el cualitativamente más favorable, del cual se hizo un precultivo, donde en un tubo falcon de 15 mL se agregaron 2 mL del medio LB-Broth y se adicionaron 2.4 μ L de ampicilina (120 μ g/mL) de un *stock* de 100 μ g/ μ L, finalmente se inoculó 1 mL del cultivo sobrante de la miniprep que cumplió con el mapa de restricción.

Tal precultivo se incubó en agitación a 170 rpm a una temperatura de 37°C durante 20 horas; transcurrido el tiempo, en dos matraces conteniendo 100 mL de medio LB-Broth y ampicilina, se les agregó a cada uno 1.5 mL del precultivo y se incubaron en agitación a 37°C durante 20 horas.

4.5.2 Extracción de ADN plasmídico ultrapuro.

Antes de la extracción se hicieron alicuotas en tubos eppendorf estériles de 1.5 ml, donde se agregaron 850 μ L de bacterias transformadas más 150 μ L de glicerol estéril, se resuspendieron suavemente, se colocaron en hielo por 20 minutos y posteriormente se almacenaron a -80 °C.

Para la extracción del ADN plasmídico se utilizó el *Kit High Speed Plasmid Midi (QIAGEN)*. En 6 tubos de centrífuga de 30 mL se distribuyó de manera equilibrada el contenido de los dos matraces para posteriormente centrifugarse a 5 000 rpm por 10 min a una temperatura de 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 7 mL de buffer 1 (mismo que contiene la enzima que ayudó a lisar las bacterias) distribuidos en los 6 tubos y al final las pastillas se resuspendieron en un solo tubo.

Se adicionaron 7 mL de buffer 2 (lisis) y se mezclaron por inversión vigorosamente hasta obtener una coloración azul homogénea en toda la mezcla y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 7 mL del buffer 3 (neutralización) previamente enfriado a 4 °C y se mezcló por inversión hasta que la coloración azul se neutralizó, esta suspensión se transfirió a un filtro cartridge con tapón, y se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente. Mientras transcurrió el tiempo, se equilibró la columna Hi Speed Midi con 4 mL de buffer QBT, terminado el tiempo se quitó la rosca del filtro cartridge, se insertó el émbolo y se filtró el lisado celular dentro de la columna cargada. Una vez que pasó todo el filtrado se hizo un lavado a la columna con 20 mL de buffer QC para que únicamente quedara en el mismo, el material genético que nos interesa. Se recuperó el ADN que quedó en la resina de la columna con 5 mL de buffer QF en un tubo falcon estéril de 15 mL. Se precipitó el ADN adicionando 3.5 mL de isopropanol, se agitó en vortex y se dejó reposar la mezcla por 5 minutos a temperatura ambiente. En una jeringa de 20 mL se colocó el filtro QIA Midi, una vez que pasó el tiempo de reposo, se transfirió el precipitado a la jeringa y se filtró introduciendo el émbolo sin hacer mucha presión para no romper la membrana del filtro. Después se lavó con 2 mL de etanol al 70% pasando aire después de eliminar el etanol.

Finalmente se usó una jeringa de 5 mL y se colocó el filtro, agregando 500 µL de buffer TE y se recuperó el ADN plasmídico en un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL, repitiendo este paso dos veces para recuperar la mayor cantidad de plásmido posible. Para saber la concentración del purificado se recurrió al uso del aparato *Nanodrop 2000*.

4.6 Secuenciación y alineamiento múltiple.

Para comprobar la mutación puntual mediante secuenciación fue necesario el diseño de un par de oligonucleótidos que amplificaran 300 pb río arriba y río abajo del codón mutado por lo que el tamaño del amplicón fue de 600 pb aproximadamente. Las muestras se agregaron en 2 tubos eppendorf de 0.6 mL donde se agregaron 10 picomoles de ADN con la probable mutación, en uno el

oligo sentido *Fw* y en el otro con el oligo antisentido *Rv* y agua libre de nucleasas para llegar a un volumen final de 20 μ L en cada tubo, esto de acuerdo a las especificaciones que pide el IBT (Instituto de Biotecnología-UNAM) que es donde se mandó a secuenciar. El resultado se recibió en formato .ab1 el cual es procesado por el programa bioinformático **Bioedit**, que al abrir muestra el electroferograma resultante, del cual se obtuvo la secuencia de nucleótidos en formato FASTA y se alineó con el programa *ClustalOmega* (Multiple Sequence Alignment, EMBL-EBI) junto con la secuencia nativa para visualizar el cambio de codón.

5 Resultados.

5.1 Comprobación de la integridad del plásmido usado.

La figura 15 representa un gel de agarosa al 0.8%, donde se visualiza el mapa de restricción del plásmido pSP64T/hH1, se observan cuatro fragmentos de ADN que resultaron de los cortes hechos por la enzima BamHI, cuyos pesos moleculares en pares de bases (pb) son: 6000, 2000, 1800 y 1500.

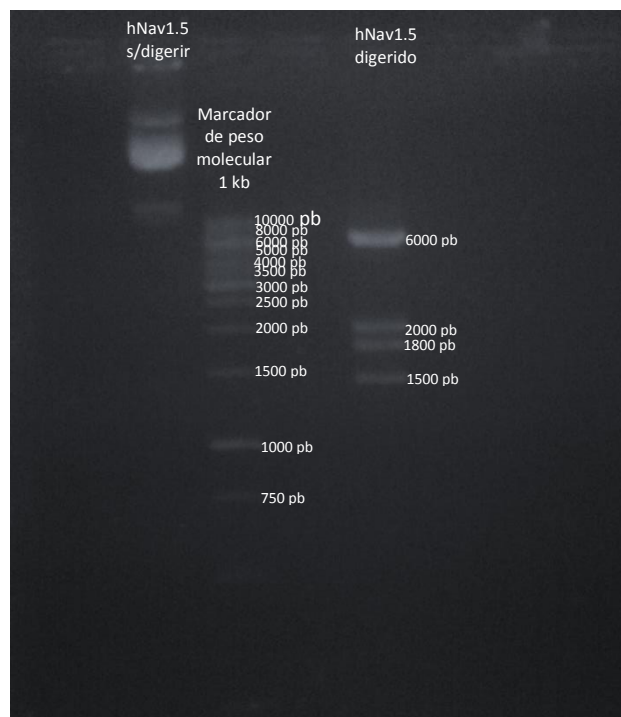
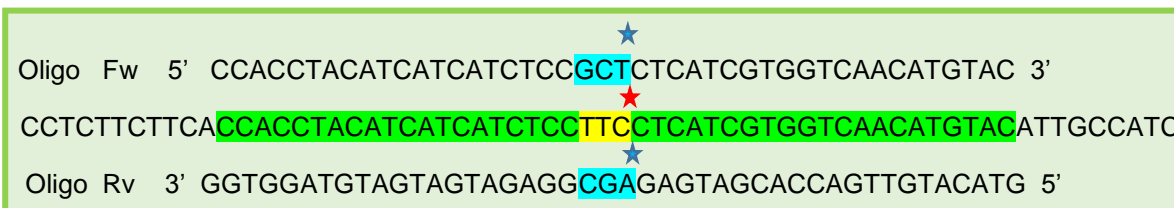


Figura 15. Mapa de restricción del plásmido pSP64T/hH1 cortado con la enzima BamHI y con sus respectivos pesos moleculares en pares de base. **Carril 1**, plásmido sin digerir; **Carril 2**, marcador de PM de 1 kb; **Carril 3**, plásmido digerido.

5.2 Oligonucleótidos mutagénicos.

Con base a los parámetros establecidos en el apartado [4.2], el diseño de oligonucleótidos que cumplió con las características adecuadas fue el siguiente:



- ★ Codón que codifica una Alanina
- ★ Codón que codifica una Fenilalanina

Tabla 8: características de los oligonucleótidos mutagénicos de acuerdo al análisis hecho con la herramienta bioinformática *Oligo-analyzer* de la página *IDT*.

Oligonucleótido	Longitud	Tm °C	% GC	# Horquillas* / [°C]
Fw	44 bases	66.8	50	3/ [23.9-27.3]
Rv	44 bases	66.8	50	5/ [26.3-34.2]

*Número de horquillas o estructuras secundarias que pueden formarse entre los rangos de temperaturas estimadas por el programa.

5.3 Producto de PCR en gradiente.

Para corroborar que los oligos mutagénicos funcionaran, se realizó una PCR en gradiente como se explicó en el apartado [4.3.1].

En la Figura 16 se muestra la electroforesis en la que se observa a la izquierda el amplicón de 370 pb con el par de oligos Fw-Sec/Rv3F1760A, y a la derecha el de 390 pb con el par de oligos Rev-Sec/Fw3F1760A. Se observan amplicones en las 5 temperaturas probadas. Para introducir la mutación por PCR, se decidió utilizar una temperatura de alineamiento de 60 °C.

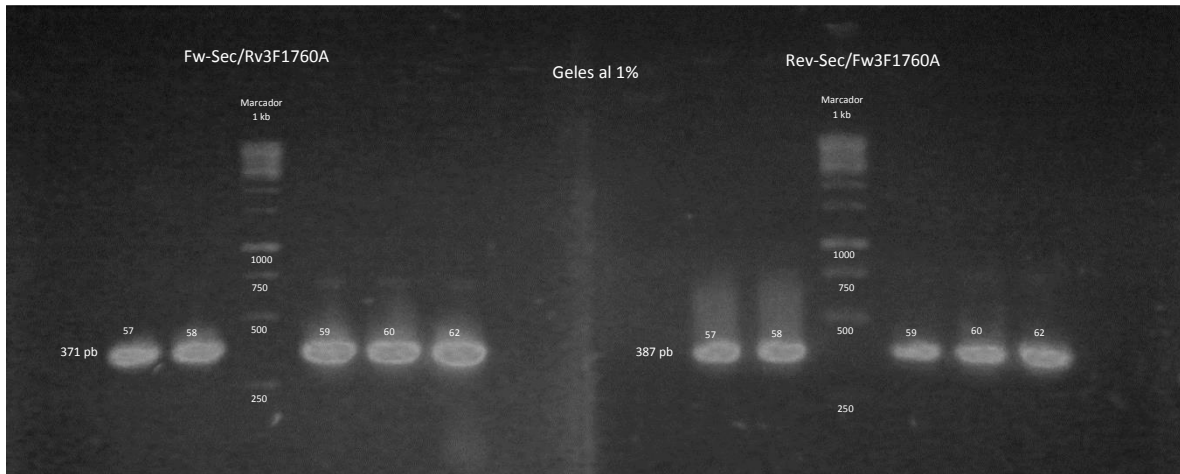


Figura 16. Gel de electroforesis donde se muestran los productos de PCR en gradiente. A la izquierda se observan los amplicones de 370 pb con el par de oligos Fw-Sec/Rv3F1760A, y a la derecha los amplicones de 390 pb con el par de oligos Rev-Sec/Fw3F1760A.

5.4 Visualización del producto de PCR punto final digerido con DpnI.

Después de digerir con DpnI para quitar el plásmido parental, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para visualizar el producto de PCR (que puede observarse o no). En la Figura 17 se muestra la electroforesis en la que se observa la banda del canal nativo como control, pero no se llegó a visualizar el producto de la PCR después de introducir la mutación. Lo cual pudo deberse a que en el protocolo de mutagénesis, consta de 18 ciclos de amplificación. Sin embargo, se prosiguió con la siguiente etapa que fue la transformación bacteriana con el producto de la PCR.

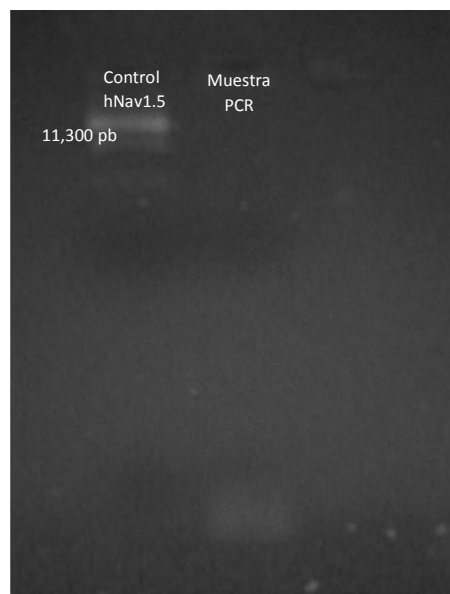


Figura 17. Gel de electroforesis al 0.8%. **Carril 1:** muestra del plásmido control. **Carril 2:** muestra del producto de PCR (no visualizado)

5.5 Transformación bacteriana.

En la Figura 18 se muestra una placa de agar-LB con ampicilina usada como método de selección de las colonias transformadas, donde se pueden observar 6 colonias con el fenotipo esperado (círculos blancos). Se amplificaron y se les extrajo el ADN plasmídico que se cuantificó y analizó por restricción.



Figura 18. Placa de agar-LB con Ampicilina. Se observa que crecieron seis colonias con el fenotipo esperado.

5.6 Mini preparación de las colonias transformadas.

5.6.1 Cuantificación.

De acuerdo con lo descrito en el apartado [\[4.4\]](#), se cuantificó el ADN plasmídico obtenido de las 6 colonias mediante espectrofotometría, a una absorbancia de 260 nm (Tabla 9).

Tabla 9: Determinación de la concentración del ADN plasmídico

MINI PREPARACIÓN	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	[ng/μL]
1	0.231	0.200	115.	1155

2	0.130	0.126	1.0	650
3	0.166	0.165	0.96	800
4	0.238	0.117	2.0	1190
5	0.169	0.099	1.7	845
6	0.285	0.158	1.8	1425

5.6.2 Restricción.

En la Figura 19 se muestra el patrón de restricción obtenido mediante la digestión con la enzima BamHI en un gel de agarosa al 0.8 %. Como se observa, las 6 colonias transformadas (carriles 2, 3, 4, 6, 7 y 8) presentaron el mismo patrón de restricción que el Control (ADN nativo), bandas de 6000, 2000, 1800 y 1500 pb. Considerando este resultado se amplificó el ADN plasmídico de la colonia MP 5, la cual presentó la mayor concentración.

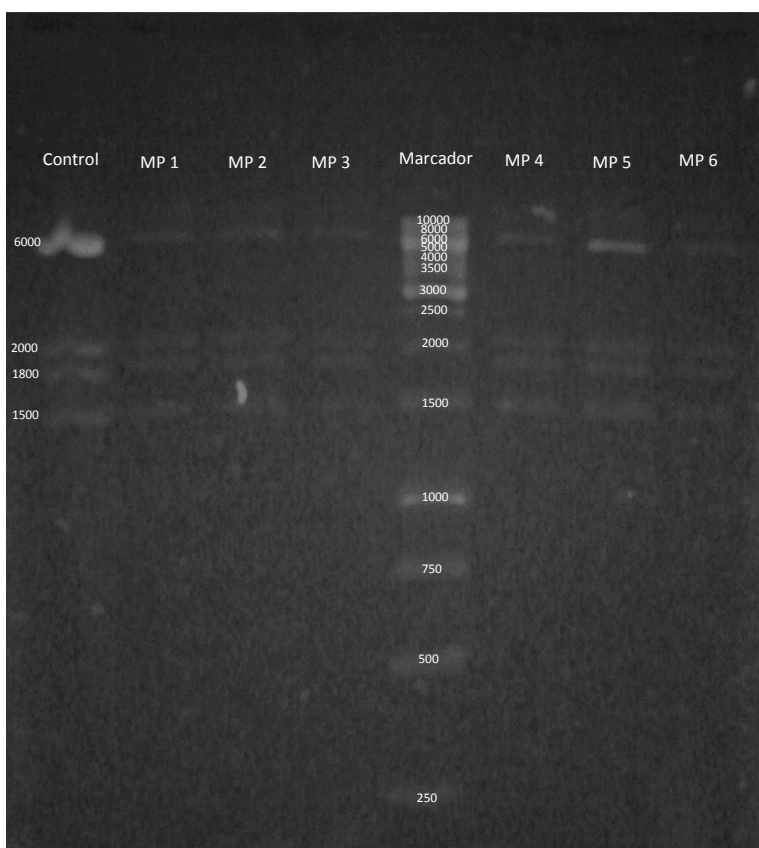


Figura 19. Gel de agarosa al 0.8% donde se visualiza el patrón de restricción esperado. **Carril 1:** ADN control. **Carriles 2-8:** ADN plasmídico cortado de las 6 colonias transformadas. **Carril 5:** marcador de peso molecular (1 kb).

5.7 Mapa de restricción del ADN plasmídico ultrapuro.

De la colonia electa se amplificó y purificó como se describe en la sección [\[4.5\]](#). Con el ADN ultrapuro, una vez más se corroboró la presencia del plásmido de interés con la realización de una digestión enzimática, el patrón de restricción resultante se comparó con la restricción de una muestra nativa en un gel de electroforesis.

En la Figura 20, se demuestra que el ADN mutado presenta el patrón de restricción esperado y de ahí se prosiguió a comprobar la presencia de la mutación mediante secuenciación.

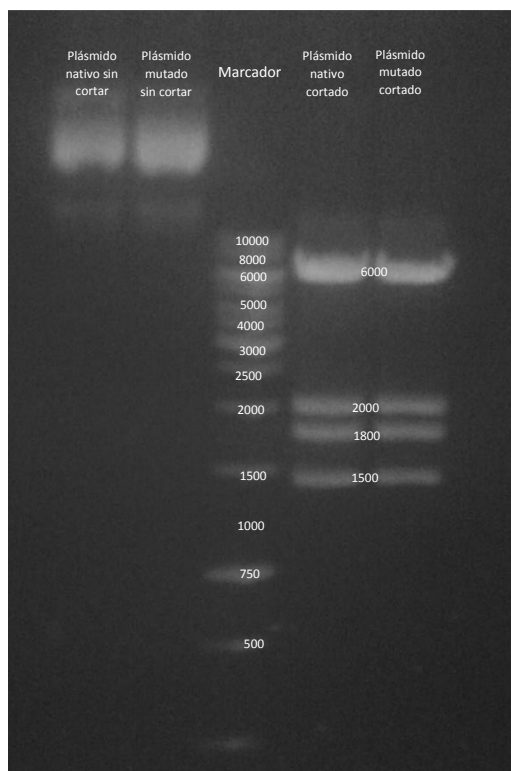


Figura 20. Gel de agarosa al 0.8% que muestra los mapas de restricción del plásmido control y el mutado. **Carril 1:** ADN nativo sin cortar. **Carril 2:** ADN mutado sin cortar. **Carril 3:** Marcador de peso molecular. **Carriles 4 y 5:** ADN nativo y mutado cortados con la enzima BamHI.

5.8 Secuenciación y alineamiento múltiple.

Para la comprobación de la mutación, se preparó una muestra del plásmido pS64T-hH1 (hNav_v 1.5) mutado y se mandó a secuenciar al *Instituto de Biotecnología de la UNAM*, lo que se obtuvo fue una secuencia de 700 bases aproximadamente, la cual fue alineada con el mismo segmento de ADN que codifica para el canal nativo, en el programa bioinformático *Clustal Omega* disponible de manera gratuita en línea. En la figura 21 se puede apreciar, que el único cambio que se generó fue el codón TTC por el codón GCT marcados en azul y amarillo respectivamente.

hNav1.5 FwF1760A	TATGTCAAGTGGGAGGCTGGCATCGACGACATGTTCAACTTCCAGACCTTCGCCAACAGC TATGTCAAGTGGGAGGCTGGCATCGACGACATGTTCAACTTCCAGACCTTCGCCAACAGC *****
hNav1.5 FwF1760A	ATGCTGTGCCTCTTCCAGATCACCACGTGCGCCGGCTGGGATGGCCTCCTCAGCCCCATC ATGCTGTGCCTCTTCCAGATCACCACGTGCGCCGGCTGGGATGGCCTCCTCAGCCCCATC *****
hNav1.5 FwF1760A	CTCAACACTGGGCCGCCCTACTGCGACCCCACTCTGCCAACAGCAATGGCTCTCGGGGG CTCAACACTGGGCCGCCCTACTGCGACCCCACTCTGCCAACAGCAATGGCTCTCGGGGG *****
hNav1.5 FwF1760A	GACTGCGGGAGCCAGCCGTGGGCATCCTCTTCTTACCACCTACATCATCATCTCC TTC ★ Fenilalanina GACTGCGGGAGCCAGCCGTGGGCATCCTCTTCTTACCACCTACATCATCATCTCC GCT ★ Alanina *****
hNav1.5 FwF1760A	CTCATCGTGGTCAACATGTACATTGCCATCATCCTGGAGAACTTCAGCGTGGCCACGGAG CTCATCGTGGTCAACATGTACATTGCCATCATCCTGGAGAACTTCAGCGTGGCCACGGAG *****
hNav1.5 FwF1760A	GAGAGCACCGAGCCCCTGAGTGAGGACGACTTCGATATGTTCTATGAGATCTGGGAGAAA GAGAGCACCGAGCCCCTGAGTGAGGACGACTTCGATATGTTCTATGAGATCTGGGAGAAA *****
hNav1.5 FwF1760A	TTTGACCCAGAGGCCACTCAGTTTATTGAGTATTCGGTCCTGTCTGACTTTGCCGACGCC TTTGACCCAGAGGCCACTCAGTTTATTGAGTATTCGGTCCTGTCTGACTTTGCCGACGCC *****
hNav1.5 FwF1760A	CTGTCTGAGCCACTCCGTATCGCCAAGCCCAACCAGATAAGCCTCATCAACATGGACCTG CTGTCTGAGCCACTCCGTATCGCCAAGCCCAACCAGATAAGCCTCATCAACATGGACCTG *****
hNav1.5 FwF1760A	CCCATGGTGAGTGGGGACCGCATCCATTGCATGGACATTCTCTTGCCTTCACCAAAAGG CCCATGGTGAGTGGGGACCGCATCCATTGCATGGACATTCTCTTGCCTTCACCAAAAGG *****
hNav1.5 FwF1760A	GTCCTGGGGGAGTCTGGGGAGATGGACGCCCTGAAGATCCAGATGGAGGAGAAGTTCATG GTCCTGGGGGAGTCTGGGGAGATGGACGCCCTGAAGATCCAGATGGAGGAGAAGTTCATG *****
hNav1.5	GCAGCCAACCCATCCAAGATCTCTACGAGCCCATCACCACCACACTCCGGCGCAAGCAC

```

FwF1760A      GCAGCCAACCCATCCAAGATCTCCTACGAGCCCATCACCACCACACTCCGCGCAAGCAC
                *****
hNav1.5       GAAGAGGTGTCGGCCATGGTTATCCAGAGAGCCTTCCGCAGGCACCTGCTGCAACGCTCT
FwF1760A      GAAGAGGTGTCGGCCATGGTTATCCAGAGAGCCTTCCGCAGGCACCTGCTGCAACGCTCT
                *****

```

Figura 21. Alineamiento múltiple de la secuencia nativa del gen que codifica a Nav1.5 y la secuenciación del ADN plasmídico mutado, donde se visualiza el cambio esperado del codón TTC por el codón GCT.

Una vez que se comprobó la introducción de la mutación en el canal hNav 1.5, se probó el efecto de la mutación en la actividad del canal, mediante la inyección en ovocitos de *Xenopus laevis* y la comparación de la biofísica con el canal nativo (esto fue realizado por Coyotl, cuyos resultados se muestran en los anexos 1 y 2).

6 Discusión

Un gran número de experimentos mutagénicos se han llevado a cabo para dar evidencia sobre el principal sitio de unión a anestésicos locales (AL), los cuales han mostrado la importancia de una variedad de residuos aminoacídicos encontrados en los dominios I, III y V, dentro de los que el aminoácido F1760 que se encuentra en el segmento 6 del dominio IVS6 (para la isoforma hNav1.5b) ha sido considerado el residuo crítico al que se unen dichos fármacos, los cuales pueden bloquear el poro dependiendo del estado funcional en el que se encuentre el canal. Teniendo evidencia sólida de la importancia de éste aminoácido, ha sido el principal residuo que se ha mutado generalmente por otro aminoácido con propiedades químicas distintas; es por eso que la mutación F1760A ya se ha reportado para el estudio molecular y biofísico así como para la caracterización de nuevos agentes químicos que han mostrado tener algún efecto de bloqueo sobre canales de sodio (Ragsdale et al., 1994; Nau et al., 2000; Yarov-Yarovoy et al., 2002; O'Reilly et al., 2012).

La mutación en el sitio de unión a AL ya se ha realizado en la isoforma Nav1.4 en el laboratorio de *Bioquímica y Biología Molecular* del Centro de Química-BUAP, obteniendo la mutante Nav1.4/F1579A (Sánchez, 2015) usada para estudios biofísicos. Por lo que para la generación de la mutación en el mismo sitio de AL en

la isoforma Nav1.5 se siguieron las especificaciones que incluye el manual del kit *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene). Sin embargo, se presentaron diversos problemas para la obtención de la mutante, así, en el primer intento se obtuvieron falsos positivos, por lo que se optó por hacer algunas modificaciones al protocolo anteriormente utilizado y rediseñar nuevamente los oligonucleótidos. Al realizar un segundo análisis bioinformático del primer par de oligonucleótidos desfasados y tomando en cuenta que el codón a mutar se encuentra en una región con secuencias en *tándem*, se encontró que el cambio del codón que se estaba realizando, introducía en ambos oligos, estructuras secundarias altamente estables en sus extremos 3' al involucrar la C y la A del codón GCA (Ala), esto, desde la primera etapa de la PCR, ya que el ΔG de la formación de tales estructuras, es negativo, es decir, espontánea. Aunando todo esto al hecho de que la *polimerasa pfu* tiene actividad exonucleasa, esta misma se encargaba de quitar esos extremos 3' incorrectos (que se encontraban cerca del codón Ala) y repolimerizaba a la secuencia complementaria "correcta", es decir, volvía a introducir el codón para Fenilalanina en lugar del codón de Alanina, lo que explica la obtención de falsos positivos.

Para evitar de nueva cuenta que se generaran estructuras secundarias en los oligonucleótidos, fue que se cambió el diseño como se muestra en el apartado [\[5.2\]](#) a oligonucleótidos complementarios con el codón GCT que igual codifica para una Alanina.

Hasta este punto se puede ver que sin importar el tipo de mutación a realizar en cualquier gen, el diseño de los oligonucleótidos que introducirán la mutación es el paso crítico para la obtención exitosa de una mutagénesis, ya que si desde el inicio se pone atención en cada aspecto molecular de los procesos, el resultado sale de manera casi inmediata.

Otro inconveniente detectado para lograr una mutagénesis fue el encontrar la T_m adecuada para la realización de la PCR de punto final para introducir la mutación a pesar de que la empresa que sintetiza los oligonucleótido manda sus características, se ha visto de manera empírica que no siempre resulta ser óptima

la T_m especificada; por lo que se realizó una PCR en gradiente a cinco temperaturas diferentes, cuyo resultado visualizado en la figura 15, permitió elucidar la mejor temperatura de alineamiento para la PCR de punto final. Además se usó otra polimerasa, la *pfu fushion Green Polimerase* en lugar de la *pfu* polimerasa convencionalmente utilizada, puesto que tiene una más alta fidelidad y una mejor posesividad. Si bien, sólo se obtuvieron 6 colonias transformadas con la reacción de PCR, la experiencia nos ha mostrado que entre menos colonias, hay mayor probabilidad de obtener la mutación.

Si bien se utilizaron las cantidades de plantilla (50 ng) y de oligonucleótidos (10 picomoles) especificados en el kit; no se observó el producto de PCR después de la digestión con la enzima *Dpn I*. Esto se puede deber a que la PCR para la mutagénesis es de 18 ciclos y no siempre se observa la banda. También es importante mencionar que la región de interés donde se encuentra el sitio de anestésicos locales, contiene secuencias en tándem, lo que dificultó el diseño de los oligonucleótidos mutagénicos. Sin embargo, se continuó con la extracción del ADN plasmídico de todas las colonias y de manera arbitraria se eligió una colonia potencialmente mutada para purificar su plásmido y comprobar la mutación por secuenciación, que como se puede observar en el resultado del apartado [\[5.8\]](#) el único cambio realizado de la secuencia de interés fue el esperado. Aunque claro está que no sólo la secuenciación de la región de interés es la prueba infalible de que la proteína será totalmente funcional, sino que, para el caso de los canales iónicos, se requieren además estudios de electrofisiología que sustenten esas bases. Por lo que otra manera en la que se pudo comprobar el cambio del aminoácido, fue mediante estudios electrofisiológicos preliminares, donde la expresión heteróloga de la proteína mutada fue totalmente funcional, con la única diferencia de que al pasar la solución con lidocaína a una concentración de 269 μM (IC_{50} reportada por Moreau y cols., 2017) el porcentaje de bloqueo de la corriente de sodio, fue de aproximadamente el 20%, comparado con el efecto de bloqueo que genera el anestésico a la misma concentración sobre la proteína nativa, donde el bloqueo de la corriente es del 50% (véase anexos 1 y 2).

7 Conclusión.

Con este trabajo se logró la obtención de la mutación F1760A en la secuencia codificante para el canal de sodio cardiaco humano (hNav1.5) clonado en el plásmido pSP64T, esto con el diseño adecuado de oligonucleótidos mutagénicos. Tal mutación se comprobó por secuenciación y la funcionalidad de esta, mediante estudios de electrofisiología.

8 Bibliografía

Ahern, C. A., Eastwood, A. L., Dougherty, D. A., & Horn, R. (2008). Electrostatic Contributions of Aromatic Residues in the Local Anesthetic Receptor of Voltage-Gated Sodium Channels. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.160663>

Ahern, C. A., Payandeh, J., Bosmans, F., & Chanda, B. (2016). The hitchhiker's guide to the voltage-gated sodium channel galaxy. *The Journal of General Physiology*, 147(1), 1–24. <https://doi.org/10.1085/jgp.201511492>

Aidley, D. (2001). *The physiology of excitable cells*. (4th ed.)

Alberts, B. et al. (2014). *Molecular Biology of the cell*. Ed Garland. (6th ed.)

Balser, J. R. (1999). Structure and function of the cardiac sodium channels, 42, 327–338.

Balser, J. R. (2001). Basic Cardiac Electrophysiology. The Cardiac Sodium Channel: Gating Function and Molecular Pharmacology. *J Mol Cell Cardiol*, 33, 599–613. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2000.1346>

Bertil, H. (1992). *Ion Channels in Excitable Membranes* (2nd ed.). <https://doi.org/10.1149/1.2100457>

Brunton, L., Parker, K., & Lazo, J. (2007). *Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la Terapéutica*. Mc Graw Hill (11th ed.).

Catterall, W. A. (2014). Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels at Atomic Resolution. *Exp Physiol*, 99(1), 1–26. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.071969.Structure>

Catterall, W. A. (2012). Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *The Journal of Physiology*, 590(11), 2577–2589. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.224204>

Catterall, W. A., Goldin, A. L., & Waxman, S. G. (2003). International Union of Pharmacology. XXXIX . Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: *Pharmacological Reviews*, 55(4), 575–578. <https://doi.org/10.1124/pr.55.4.7.folding>

Catterall, W. a, Goldin, A. L., & Waxman, S. G. (2005). International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 397–409. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.4.and>

Catterall, W. a, & Protein, T. S. C. (2000). From Ionic Currents to Molecular Mechanisms: The Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron*, 26, 13–25. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81133-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81133-2)

Catterall, W. A. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(8), 1–23. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003947>

Catterall, W. A., & Swanson, T. M. (2015). Structural Basis for Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels, (July), 141–150.

De Lera Ruiz, M., & Kraus, R. L. (2015). Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(18), 7093–7118. <https://doi.org/10.1021/jm501981g>

Eisenberg, B. (2000). Ionic Channels in Biological Membranes. *Biophysics*, 4842(95), 1–57. <https://doi.org/10.1021/ar950051e>

Fozzard, H. A., Sheets, M. F., & Hanck, D. A. (2011). The sodium channel as a target for local anesthetic drugs, 2(November), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fphar.2011.00068>

Gellens, M. E., George, A. L., Chen, L. Q., Chahine, M., Horn, R., Barchi, R. L., & Kallen, R. G. (1992). Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(2), 554–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.2.554>

Goldin, A. L. (1999). Diversity of mammalian voltage-gated sodium channels. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 868, 38–50. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb11272.x>

Groome, J. R., & Ruben, P. C. (2014). *Voltage Gated Sodium Channels. Handbook of experimental pharmacology* (Vol. 221). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-41588-3>

Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1990). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *Bulletin of Mathematical Biology*, 52(1–2), 25–71. <https://doi.org/10.1007/BF02459568>

Lamas, J. a. (2005). Evolución del concepto de potencial de reposo neuronal aspectos basicos y clinicos. *Rev Neurol*, 41(9), 538–549.

Lamberti, P. W., & Rodríguez, V. (2007). Desarrollo del modelo matemático de Hodgkin y Huxley en neurociencias. *Electroneurobiología*, 15(4), 31–60.

La Torre, R., López, J., Bezanilla, F. e Ilinás R. (1996). *Biofísica y Fisiología Celular*.

Lipkind, G. M., & Fozzard, H. A. (2005). Molecular Modeling of Local Anesthetic Drug Binding by Voltage-Gated Sodium Channels □, 1611–1622. <https://doi.org/10.1124/mol.105.014803.of>

Marban, E., Yamagishi, T., & Tomaselli, G. F. (1998). Topical Review Structure and function of voltage-gated sodium channels. *Journal of Physiology*, 508(3), 647–657.

McNulty, M. M., Edgerton, G. B., Shah, R. D., Hanck, D. A., Fozzard, H. A., & Lipkind, G. M. (2007). Charge at the lidocaine binding site residue Phe-1759 affects permeation in human cardiac voltage-gated sodium channels, 2, 741–755. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.130161>

Moreau, A., Mercier, A., Thériault, O., Boutjdir, M., Burger, B., Keller, D. I., & Chahine, M. (2017). Biophysical, Molecular, and Pharmacological Characterization of Voltage-Dependent Sodium Channels From Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Canadian Journal of Cardiology*, 33(2), 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2016.10.001>

Nau, C., Wang, S., Strichartz, G. & Wang, G. Block of Human Heart hH1 Sodium Channels by the Enantiomers of Bupivacaine. *Anesthesiology* 2000; 93(4):1022-1033.

NEHER, E., & SAKMANN, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260(5554), 799–802. <https://doi.org/10.1038/260799a0>

Noda, M., Ikeda, T., Suzuki, H., Takeshima, H., Takahashi, T., Kuno, M., & Numa, S. (1986). Expression of functional sodium channels from cloned cDNA. *Nature*, 322(6082), 826–8. <https://doi.org/10.1038/322826a0>

Nuss, H. B., Tomaselli, G. F., & Marbán, E. (1995). Cardiac sodium channels (hH1) are intrinsically more sensitive to block by lidocaine than are skeletal muscle (μ 1) channels. *The Journal of General Physiology*, 106(6), 1193–209. <https://doi.org/10.1085/jgp.106.6.1193>

O'Reilly, A., Eberhardt, E., Weidner, C., Alzheimer, C., Wallace, B. & Lampert, A. (2012) Bisphenol A Binds to the Local Anesthetic Receptor Site to Block the Human Sodium Channel. *PLoS ONE* 7(7): e41667. Doi:10.1371/journal.pone.0041667

Ragsdale DS, McPhee JC, Scheuer T & CatterallWA (1994). Molecular determinants of state-dependent block of Na⁺ channels by local anesthetics.

Savio-Galimberti, E., Gollob, M. H., & Darbar, D. (2012). Voltage-gated sodium channels: Biophysics, pharmacology, and related channelopathies. *Frontiers in Pharmacology*, 3 JUL(July), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00124>

Tian, C., Zhu, R., Zhu, L., Qiu, T., Cao, Z., & Kang, T. (2014). Potassium channels: Structures, diseases, and modulators. *Chemical Biology and Drug Design*, 83(1), 1–26. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12237>

Yu, F. H., & Catterall, W. a. (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biology*, 4(3), 207. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-3-207>

Ruiz, M. D. L., & Kraus, R. L. (2015). Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. <https://doi.org/10.1021/jm501981g>

Tikhonov, D. B., & Zhorov, B. S. (2007). Sodium Channels : Ionic Model of Slow Inactivation and State-Dependent Drug Binding, 93(September). <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.100248>

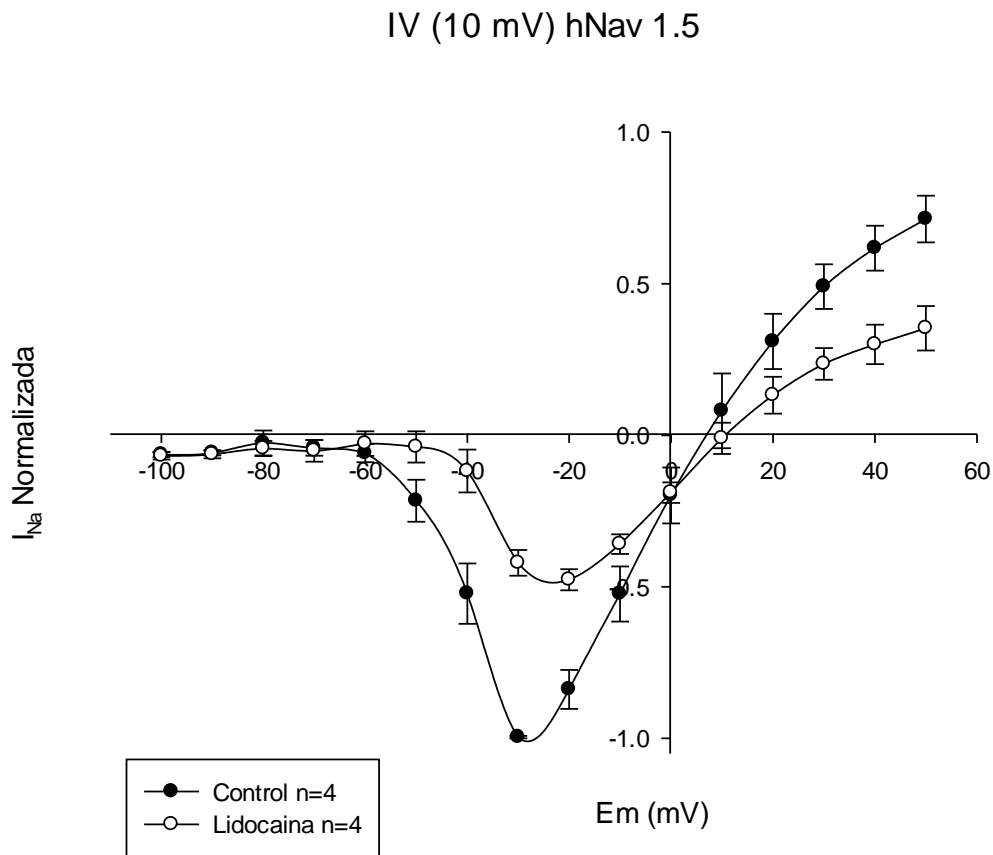
Wang, G. K., Russell, G., & Wang, S. (2013). Robust expression and distinct open-channel selectivity among Class 1 antiarrhythmics Persistent human cardiac Na⁺ currents in stably transfected mammalian cells, (August), 263–274.

Zhang, H., Ji, H., Liu, Z., Ji, Y., You, X., Ding, G., & Cheng, Z. (2014). Voltage-dependent blockade by bupivacaine of cardiac sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes, 30(4), 697–710. <https://doi.org/10.1007/s12264-013-1449-1>

ANEXO 1

Relación Corriente contra Voltaje

En la figura de abajo se muestra la relación corriente contra voltaje en condiciones control del canal hNav1.5 nativo y en presencia de 269 μM de lidocaína, la cual provocó un bloqueo aproximado del 50 %.

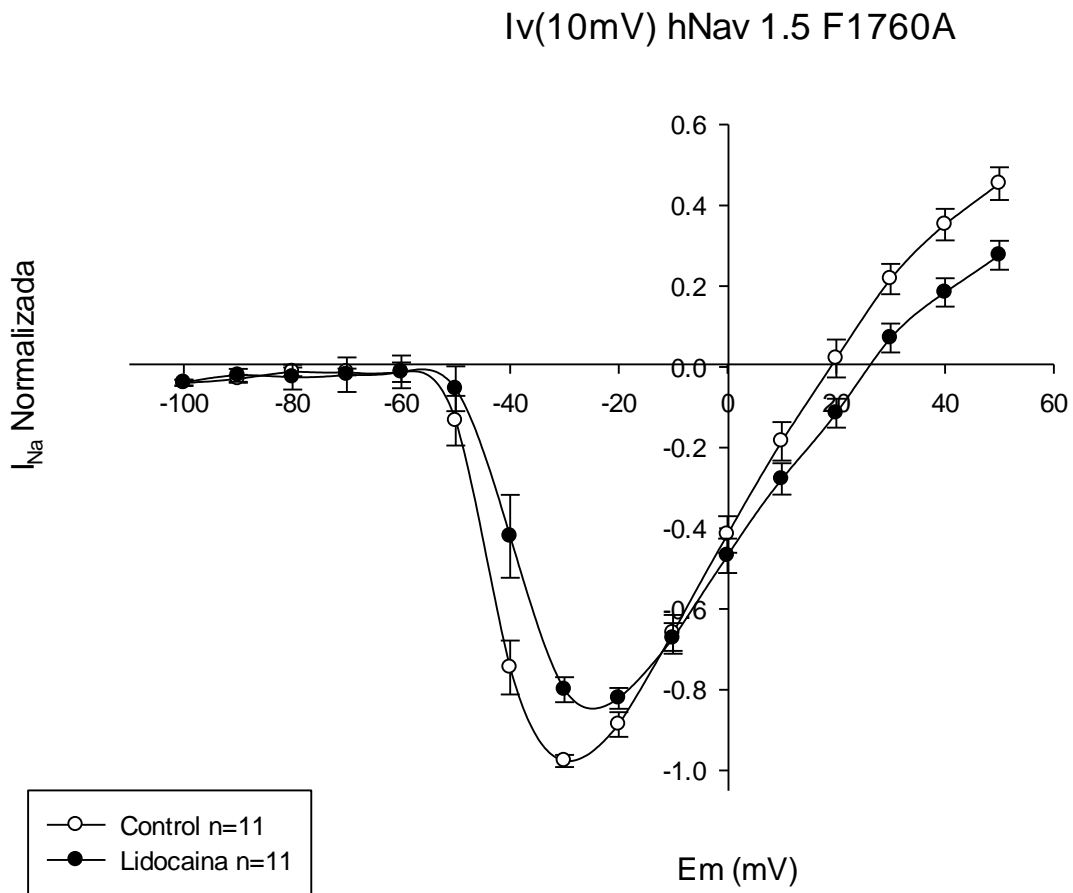


(Coyotl, 2018)

La relación corriente contra voltaje fue construida midiendo la magnitud de la corriente al pico generada en cada paso de voltaje, posteriormente se graficaron en función del potencial de membrana.

ANEXO 2

En la figura de abajo se muestra una segunda relación corriente contra voltaje en condiciones control del canal mutado hNav1.5/F1760A y en presencia de 269 μM de lidocaína, la cual provocó un bloqueo aproximado del 20 %, debido al cambio del aminoácido que forma parte del sitio de unión a anestésicos locales.



(Coyotl, 2018)