



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Clonación parcial de los ADNc de los canales de Ca^{2+}
dependientes del voltaje de la familia *Cav2* de la tortuga
Trachemys scripta elegans.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

NAYELY FONSECA MONTERO

2020

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JUAN MANUEL ARIAS MONTAÑO



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México. 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Para la realización del presente trabajo se contó con el financiamiento otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN216215) al Dr. Juan Manuel Arias Montaña.

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Electrofisiología del Proyecto de Neurociencias, en la Unidad de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias de la Salud y Educación (UIICSE), de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Este trabajo se llevó a cabo bajo la asesoría y dirección del

Dr. Juan Manuel Arias Montaña

Proyecto de Neurociencias, UIICSE, FESI-UNAM

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE

Dr. Santiago Martínez Calvillo

VOCAL

Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras

SECRETARIO

Dr. Juan Manuel Arias Montaña

SUPLENTE

Dr. Elías Piedra Ibarra

SUPLENTE

Dr. José Alejandro Sandoval Romero

Agradecimientos

A la máxima casa de estudios la Universidad Nacional Autónoma de México, mi segunda casa, por abrirme sus puertas al conocimiento para ser una mujer de ciencia. Me has enseñado a estar al servicio de mi país y de la humanidad, a ser una profesionista útil para la sociedad, es un orgullo pertenecer a esta institución.

Al programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica por el financiamiento otorgado.

Al Dr. Juan Manuel Arias por compartir su conocimiento y experiencia en cada paso de este proyecto. Gracias por haberme apoyado y acompañado con gran atención y paciencia.

A mis asesores Dr. Santiago Martínez, Dr. Jorge Campos, Dr. Elías Piedra, Dr. Alejandro Sandoval por su atención, apoyo y consejos para que este trabajo fuera realizado de la mejor manera.

A la Dra. Marta Salcedo por su apoyo durante mi servicio social y su vocación como profesora.

A mis padres por su apoyo incondicional.

Dedicatorias

A Alicia mi abuela, que me viste crecer y sin decir una palabra me enseñaste más que cualquier persona.

A mi padre por enseñarme a nunca rendirme y a seguir adelante a pesar de las circunstancias, a trabajar duro y a buscar siempre lo mejor. Gracias por apoyarme en cada paso. Gracias por siempre cuidarme. Gracias por ser mi héroe.

A mi madre por estar a mi lado con el corazón siempre grande. Por enseñarme a disfrutar la vida y apoyarme en cada decisión. Gracias porque Jehová siempre me bendice.

A Moy por enseñarme a utilizar el alma y el corazón. Gracias por ser mi cómplice, gracias por reír conmigo. Qué suerte tengo de que la vida me dio al mejor compañero.

A Abigail por enseñarme a ser una mujer fuerte y con valentía. Estudiar para ser libre.

A Roberto por alentarme a mirar siempre las estrellas y preguntarme ¿por qué? Gracias por compartir tus palabras y tu conocimiento.

A Sofi, por siempre escuchar y ser una mujer de ejemplo.

A Guillermo por que no te rindes a pesar de las dificultades y siempre sigues adelante.

A Delfino, porque siempre has estado a mi lado con tus palabras siempre tan adecuadas y los tiempos exactos. Poesía, versos, historias, ciencia. Me enseñas la vida. Me enseñas a creer en Dios aunque sabes que no existe.

A Krishna mi hermana desde que nacimos, gracias por estar a mi lado.

A Fany y Laura porque creamos sueños juntas y ahora luchamos por alcanzarlos.

A Diana mi compañera de locuras en la prepa 9. Gracias por tus palabras de aliento cada que las necesito.

A Javier, amigo gracias por tu apoyo y amistad durante la carrera.

Gracias a mis compañeros de laboratorio Raúl, Karen, Itzel, Iván, Jorge y Juan por su compañerismo y apoyo.

Por mi raza hablará el espíritu.

Estudiar para enseñar.

ÍNDICE

RESUMEN	I
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 MEMBRANA PLASMÁTICA Y CANALES IÓNICOS.....	1
1.2 CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE	3
1.2.1 ESTRUCTURA DE LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE	4
1.2.2 NOMENCLATURA DE LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE	7
1.2.3 CLASIFICACIÓN DE LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE	8
1.3 CANALES DE CALCIO DE LA FAMILIA Cav2	12
1.4 CANALOPATÍAS DE LA FAMILIA CAV2	16
1.5 LA TORTUGA COMO MODELO PARA ESTUDIAR LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE	19
II. HIPÓTESIS	23
III. OBJETIVOS.....	23
3.1 GENERAL.....	23
3.2 PARTICULARES	23
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
4.1 Diseño de oligonucleótidos degenerados	24
4.2 Síntesis del ADNc a partir del ARN total del cerebro de la tortuga <i>T. scripta elegans</i>	25
4.3 Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa de los fragmentos de ADNc utilizando los oligonucleótidos degenerados.	25
4.4 Electroforesis en gel de agarosa.....	26
4.5 Purificación de los fragmentos amplificados de ADNc cacnf4-cacnr2.....	27
4.6 Ligación del fragmento amplificado de ADNc cacnf4-cacnr2 al vector pJET1.2.....	28
4.7 Transformación de bacterias competentes.....	28
4.8 Purificación del ADN plasmídico	29
4.9 Análisis de restricción para identificar las isoformas presentes en los fragmentos amplificados	29
4.10 Secuenciación y análisis de los fragmentos seleccionados.....	30

4.11	Diseño de oligonucleótidos específicos a partir del transcriptoma del ARNm de <i>T. scripta elegans</i> .	30
4.12	Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa de los fragmentos de ADNc utilizando los oligonucleótidos específicos para el canal Cav2.1.	32
4.13	Amplificación anidada por la reacción en cadena de la polimerasa de los fragmentos de ADNc utilizando los oligonucleótidos específicos para el canal Cav2.1.	33
4.14	Análisis de restricción para identificar los fragmentos amplificados positivos de los ADNc del canal Cav2.1 de <i>T. scripta elegans</i> .	34
4.15	Amplificaciones con oligonucleótidos específicos distantes entre sí a partir del transcriptoma del ARNm de <i>T. scripta elegans</i> .	34
4.16	Selección de fragmentos positivos en las amplificaciones para su purificación y análisis.	35
V.	RESULTADOS	36
5.1	Verificación del ADNc por la RT-PCR.	36
5.2	Clonación parcial de los CCDV de la familia Cav2 de <i>Trachemis scripta elegans</i> .	37
5.3	Identificación de las clonas correspondientes a los canales α B.	39
5.4	Identificación de las clonas correspondientes a los canales α 1A.	40
5.5	Identificación de las clonas correspondientes a los canales α E.	42
5.6	Análisis de las secuencias de los plásmidos obtenidos de la amplificación con los oligonucleótidos cacnf4-cacnr2.	43
5.7	Clonación de los CCDV Cav2.1 utilizando oligonucleótidos específicos basados en el Transcriptoma.	49
5.8	Análisis de restricción para verificar la identidad de las amplificaciones anidadas con los oligonucleótidos específicos diseñados a partir del transcriptoma del canal Cav2.1 de <i>T. scripta elegans</i> .	51
5.9	Amplificaciones con oligonucleótidos específicos distantes entre sí a partir del transcriptoma del ARNm de <i>T. scripta elegans</i> .	52
5.10	Fragmentos TseCav2.1F2-TseCav2.1R1 y TseCav2.1F8-TseCav2.1R7 regiones seleccionadas para ser secuenciadas.	54
VI.	DISCUSIÓN	56
VII.	CONCLUSIÓN	64
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	65

RESUMEN

Los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) participan en diferentes eventos intracelulares: contracción, secreción, transmisión sináptica, regulación de enzimas, fosforilación y desfosforilación de proteínas y la transcripción genética. Están compuestos por la subunidad α_1 y tres subunidades accesorias β , $\alpha_2\delta$ y γ , estas tienen funciones regulatorias dependiendo del tipo de canal de calcio que conformen. Los CCDV se clasifican de acuerdo con sus características fisiológicas y farmacológicas, derivando en dos grupos: canales de alto umbral (HVA) y canales de bajo umbral (LVA), los cuales se subdividen en las familias Cav1, Cav2 y Cav3. Los canales de la familia Cav2 tienen una expresión importante en el sistema nervioso de los cordados, responsables del inicio de la neurotransmisión en la sinapsis química, mediando la entrada de Ca^{2+} al soma y a las dendritas de las neuronas. La familia Cav2 se divide en tres subunidades Cav2.1, Cav2.2 y Cav2.3. Los canales Cav2.1 conducen corrientes de tipo P/Q y juegan un rol muy importante en la liberación del neurotransmisor en células del sistema nervioso central. Los canales Cav2.2 conducen corrientes tipo N son los más importantes en sinapsis de neuronas del sistema nervioso periférico. Los canales Cav2.3 conducen corriente tipo R y son importantes en el mecanismo de sinapsis rápidas en el sistema nervioso central. El mal funcionamiento de los canales de calcio de la familia Cav2 puede derivarse de mutaciones genéticas en la región que codifican para estos, las cuales, llevan a la ganancia o pérdida de su función que generan diversas patologías como la migraña hemipléjica y la ataxia. Las tortugas son utilizadas como modelo de estudio para la neurobiología por su tolerancia a la hipoxia, la cual está relacionada directamente con el funcionamiento de los canales de calcio. En este trabajo se ocupa como modelo de estudio a la especie *Trachemys scripta elegans* para conocer las secuencias de los canales de calcio de la familia Cav2 y mostrar sus diferencias o similitudes con las secuencias de los otros grupos de vertebrados. Se clonaron de forma parcial los ADNc de los canales de calcio dependientes de voltaje de la familia Cav2 de la tortuga *T. scripta elegans* mediante el diseño de

oligonucleótidos degenerados y posteriormente específicos para amplificar regiones hacia el extremo 3'. Se utilizaron las técnicas de amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la transcripción en reversa, así como su caracterización por análisis de restricción y secuenciación. Se compararon las secuencias obtenidas con las de otros grupos de vertebrados. Las longitudes de los amplificadores fueron las esperadas, el amplificador cacnf4-cacnr2 fue de ~1,700 pb, mientras que el fragmento cacnf1-cacnr2 fue de un tamaño de ~350 pb. Se realizó un análisis de restricción para identificar las isoformas α_{1A} , α_{1B} y α_{1E} . La subunidad α_{1A} presenta una similitud del 99% con *C. picta belli*, 94% con la especie *Chelonia mydas* y el 91% con *Pelodiscus sinensis*. La subunidad α_{1B} presenta una similitud del 99% con las tres especies antes mencionadas, lo mismo que la subunidad α_{1E} presenta el 97% de similitud. El porcentaje de similitud entre las secuencias de los CCDV de *T. scripta elegans* evidentemente es mayor con *Chrysemys picta*, una especie de reptil, y diverge en algunas bases con los otros grupos. En el alineamiento múltiple de cada uno de los fragmentos amplificados de *T. scripta elegans* (α_{1A} , α_{1B} y α_{1E}) con las especies de vertebrados muestra un porcentaje alto de coincidencia en los aminoácidos de los 5 grupos con la especie modelo. La especie con la que presenta mayor número de diferencias es con el anfibio *Xenopus tropicalis*, teniendo un mayor número de coincidencias con *Chrysemys picta*.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 MEMBRANA PLASMÁTICA Y CANALES IÓNICOS

La célula está delimitada por una membrana plasmática, la cual está compuesta por una bicapa de fosfolípidos, proteínas y algunos carbohidratos. Las funciones generales de la membrana plasmática son el aislamiento físico, la comunicación entre la célula y su medio, el sostén estructural y la regulación del intercambio de sustancias con el medio (Silverthorn 2009).

La membrana celular posee una cara interna y una externa, denominadas cara citosólica y cara exoplasmática, respectivamente. La cara exoplasmática de la membrana está dirigida hacia el medio externo y define el límite exterior de la célula, mientras que la cara citosólica se encuentra hacia el interior celular, interaccionando con el líquido intracelular. Las membranas están compuestas principalmente por moléculas anfipáticas que tienen una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica, estas últimas forman la bicapa lipídica en donde las colas de los ácidos grasos se encuentran dispuestas hacia el centro y las cabezas de fosfolípidos hacia el medio acuoso dentro y fuera de la célula. Los lípidos más comunes que forman la bicapa celular son fosfoglicéridos, esfingolípidos y esteroides; cabe mencionar que la composición lipídica influye en las propiedades físicas de las membranas (Lodish 2012).

La membrana plasmática también está compuesta de proteínas; cada célula contiene entre 10 y 50 tipos de proteínas insertas en su membrana. Las proteínas asociadas con una membrana en particular son responsables de sus actividades distintivas; la densidad y la dotación de las proteínas asociadas varían según el tipo de célula y la ubicación subcelular. Las proteínas de las membranas se pueden clasificar en tres categorías: integrales, ancladas por lípidos y periféricas.

La membrana plasmática es una barrera permeable selectiva entre la célula y el ambiente extracelular. Sus propiedades de permeabilidad aseguran que las moléculas esenciales como iones, glucosa, aminoácidos y lípidos entren fácilmente en la célula, que los intermediarios metabólicos permanezcan en ella y los compuestos de desecho salgan; esto significa que la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática le permite a la célula mantener un ambiente interno constante. Los movimientos de prácticamente todos los iones y moléculas a través de las membranas celulares son mediados por las proteínas transportadoras inmersas en la bicapa lipídica (Andreoli 1986).

Un tipo de proteínas integrales de la membrana son los canales iónicos, que permiten el flujo de iones (Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , H^+ y Cl^-) a favor de su gradiente electroquímico. Estructuralmente los canales están provistos de un poro, que además constituye el filtro de selectividad, para permitir el paso de los iones hacia dentro o fuera de la célula. La selectividad del canal está dada además por un estrechamiento con cargas negativas o positivas cerca de la superficie externa de la membrana. Los canales iónicos se diferencian por la selectividad iónica, es decir, el tipo de iones que permiten pasar y por la regulación, esto es, las condiciones que determinan la apertura y el cierre del canal (Tamargo 2004).

De acuerdo con su mecanismo de activación, estas proteínas pueden dividirse en: canales mecanosensibles, canales activados por ligando y canales activados por voltaje. En los canales mecanosensibles, la apertura es activada por una fuerza mecánica ejercida sobre el canal; este mecanismo a su vez genera una señal eléctrica que se transmite en cascada hasta llegar al último receptor. Los canales iónicos activados por ligando se abren en respuesta a la unión de una sustancia química (hormonas, péptidos o neurotransmisores), con una parte del canal llamado receptor, que crea un cambio en la energía libre y altera la conformación de la proteína abriendo el canal. Por su parte, los canales iónicos regulados u operados por voltaje desempeñan el papel principal en la propagación de señales eléctricas

en las células nerviosas, aunque también están presentes en muchas otras células como las musculares, los oocitos, los protozoos e incluso en células vegetales. Estos canales poseen dominios proteicos especializados con carga que reciben el nombre de sensores de voltaje y que son sumamente sensibles a las modificaciones del potencial de membrana; las alteraciones de este potencial por arriba de cierto umbral ejercen una fuerza sobre los dominios proteicos de magnitud suficiente para inducir el paso del canal de la conformación cerrada a la abierta o viceversa (Alberts 2006).

1.2 CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE

Los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) activan la despolarización de la membrana plasmática en muchos tipos de células, esto en respuesta a potenciales de acción que llegan a la célula. El ión Ca_{2+} que entra a la célula a través de los canales sirve como segundo mensajero de la señalización eléctrica, iniciando muchos procesos fisiológicos celulares diferentes (Catterall 2011).

En células del músculo cardíaco, la activación de los canales de Ca_{2+} inicia la contracción directamente, aumentando la concentración citosólica del ion, y promueve la liberación de Ca_{2+} por la activación de los receptores de rianodina en el retículo sarcoplásmico (Fabiato 1983, Andreoli 1986, Bers 2002, Rueda 2014). En células endocrinas, los canales de calcio dependientes de voltaje median la iniciación de la secreción de hormonas como la insulina en las células beta pancreáticas (Yang y Berggren 2006). En las neuronas el ingreso de iones calcio en el citosol presináptico desencadena la fusión de las vesículas sinápticas a la membrana y la liberación del neurotransmisor (Moreno 2005).

En diferentes células, la entrada de Ca_{2+} al citosol controla actividades como el aumento o disminución de la actividad de cinasas o fosfatasas de proteínas y la expresión de genes, así como diversos eventos bioquímicos (Latorre 1996, Flavell y Greenberg 2008, Leon-Iza 2010) (Figura 1).

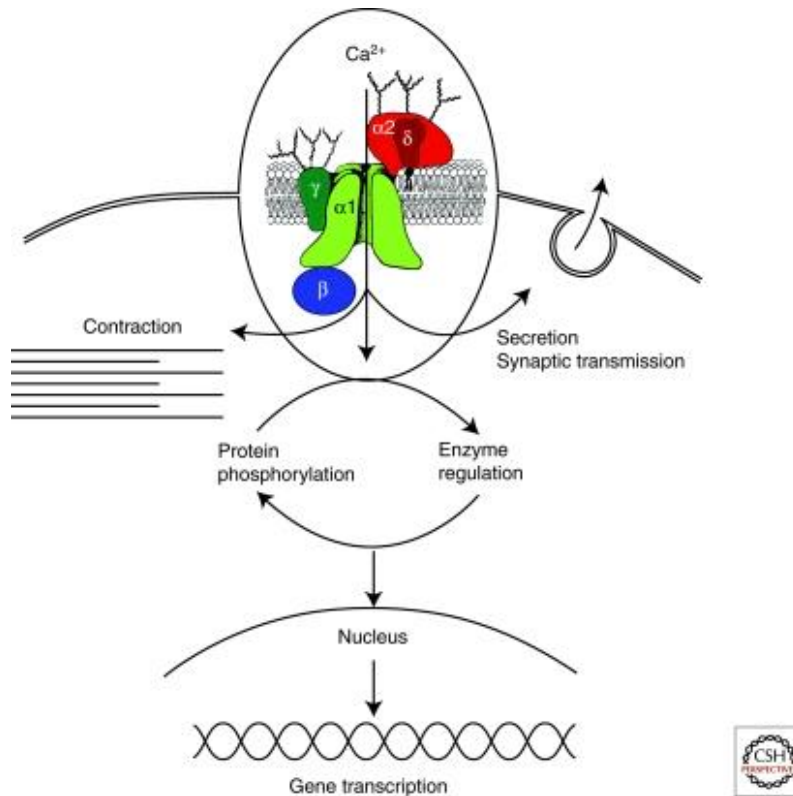


Figura 1. Participación de los CCDV en diferentes eventos intracelulares, incluyendo la contracción, la secreción, la transmisión sináptica, la regulación de enzimas, la fosforilación y defosforilación de proteínas y la transcripción genética. Se representan las subunidades que conforman a los canales de calcio dependientes de voltaje (la subunidad α_1 forma el poro central; una subunidad $\alpha_2\delta$, que es una glicoproteína dimérica unida por puentes disulfuro; una subunidad intracelular llamada β ; y una glicoproteína transmembranal llamada γ). (Tomado de Catterall 2011).

1.2.1 ESTRUCTURA DE LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE

Los CCDV están conformados por una subunidad α_1 y otras subunidades accesorias, las cuales tienen funciones regulatorias; dependiendo del tipo de canal de calcio que conformen, estas subunidades son: β , $\alpha_2\delta$ y γ (Figura 1) (Catterall 2000).

La subunidad α_1 es una proteína transmembranal de una longitud de alrededor 2 000 aminoácidos y 190-250 kDa (Takahashi, Seagar et al. 1987). Está conformada por cuatro dominios homólogos (I-IV), cada uno de los cuales contiene seis segmentos transmembranales (S1-S6) y un asa del poro (P) entre los segmentos

S5-S6 (Figura 2). Esta subunidad es la que contiene el poro hidrofílico de conducción iónica delineado por los segmentos transmembranales S5 y S6, así como el filtro de selectividad iónica formado por el asa P por donde el Ca^{2+} permea a través de la membrana plasmática. Se sabe que la presencia de glutamatos y aspartatos en el poro es determinante para que los canales seleccionen el Ca^{2+} sobre otros cationes. El sensor de voltaje, localizado en el segmento S4 de cada dominio, consiste en una hélice alfa transmembranal, donde cada tres o cuatro aminoácidos hay uno cargado positivamente (lisina o arginina). La subunidad α_1 tiene en su secuencia regiones de interacción con sus subunidades accesorias y sitios de unión de diversos activadores o bloqueadores, motivos de unión a proteínas G y propensos a la fosforilación; algunos de estos sitios de interacción son comunes, por ejemplo, el de interacción con la subunidad β , mientras que otros son específicos del tipo de canal (Latorre 1996, Lacinova 2005, Catterall 2011) (Figura 2).

La subunidad β es una proteína auxiliar intracelular co-expresada con la subunidad α_1 de todos los canales que se activan a un voltaje alto de membrana (-40 mV a -10 mV). En sistemas de expresión heterólogos, esta subunidad se requiere para la expresión funcional de las subunidades α_1 con el fin de mejorar la densidad de corriente y regular la dependencia al voltaje de la activación e inactivación de los canales de calcio. Se han identificado cuatro isoformas de esta subunidad (β_{1-4}) codificadas por distintos genes; cada isoforma tiene múltiples variantes de empalme (splicing), y por lo tanto un tamaño diferente. Esta subunidad regula diferentes aspectos de la fisiología de los canales activados por alto voltaje (*High Voltage Activated* HVA), incluyendo la expresión en la superficie, la degradación y el mecanismo de apertura o cierre. También es fundamental para la regulación de los canales de calcio dependientes de voltaje por lípidos, proteínas G, cinasas, fosfatasas y otras proteínas de señalización, así como sustancias de bloqueo (Murakami, Fleischmann et al. 2002, Lacinova 2005, Buraei y Yang 2013) (Figura 2).

La subunidad $\alpha_2\delta$ es una proteína glicosilada y tiene un tamaño aproximado de 175 kDa. Estas subunidades se derivan de un solo gen (Ellis, Williams et al. 1988),

en donde después de la traducción los péptidos α_2 y δ son generados por proteólisis y unidos por un enlace disulfuro (Figura 2). El dominio δ , que contiene el único segmento transmembranal del complejo $\alpha_2\delta$, alberga las regiones importantes para el cambio de la activación e inactivación de canales tipo HVA además de la modulación de la cinética de inactivación. Similar a la subunidad β , la subunidad $\alpha_2\delta$ puede modular la interacción de los canales de calcio con sustancias de bloqueo, como lo es el sitio de unión de gabapentinoides. Se demostró que la subunidad $\alpha_2\delta$ reduce la tasa de activación como de inhibición del equilibrio del canal Cav2.2 por las ω -conotoxinas (Gurnett, De Waard et al. 1996, Felix, Gurnett et al. 1997, Lacinova, Klugbauer et al. 1999, Mould, Yasuda et al. 2004, Lacinova 2005) (Figura 2).

La subunidad γ es una proteína integral de membrana que contiene cuatro segmentos, de la cual existen 8 genes diferentes que se expresan en tejidos diferentes de acuerdo con su función. Esta subunidad altera las corrientes de Ca^{2+} y su cinética de inactivación, en donde las subunidades α_1 y β están involucradas (Lacinova 2005, Buraei y Yang 2010) (Figura 2).

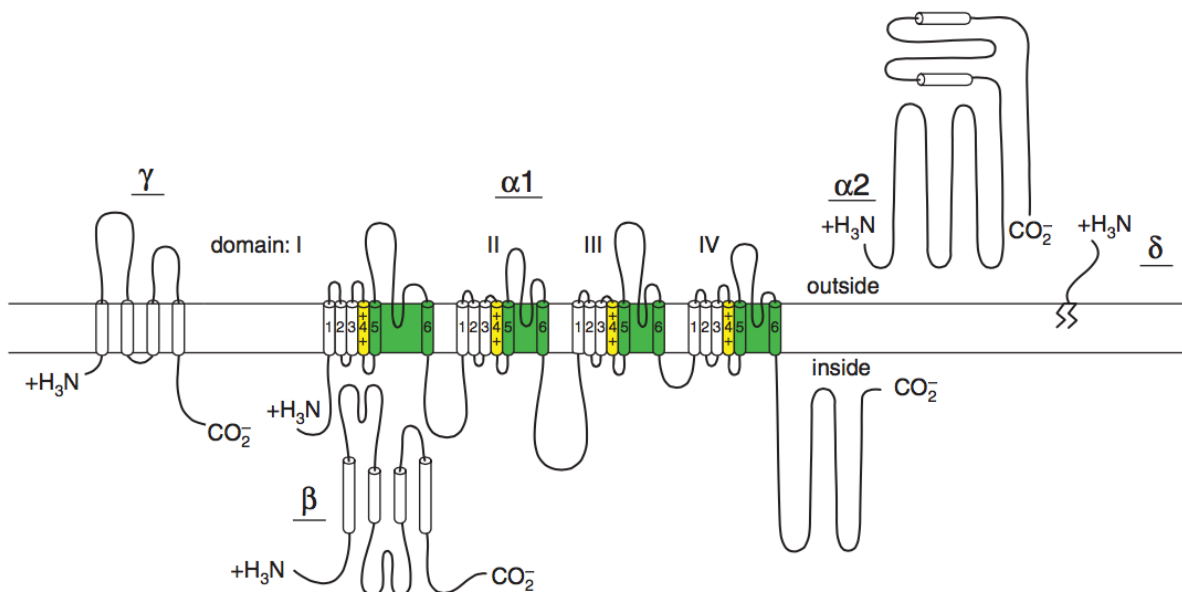


Figura 2. Representación de la estructura de los CCDV como modelos transmembranales plegables. Las hélices se presentan como cilindros; las longitudes de las líneas están correlacionadas aproximadamente a las longitudes de los segmentos de polipéptidos representados. La línea en zigzag en la subunidad δ representa su ancla de glicosilfosfatidilinositol. (Tomado de Catterall 2011).

1.2.2 NOMENCLATURA DE LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE

La nomenclatura de los CCDV se basa principalmente en las características de la subunidad α_1 . En el año de 1994 se adoptó una nomenclatura unificada basada en el sistema más ampliamente aceptado en el momento, partiendo de que la isoforma α_{1S} se refiere a la descubierta en músculo esquelético, y las subunidades α_{1A} a α_{1E} para las isoformas descubiertas posteriormente; desde entonces se han identificado nuevas subunidades α_1 , denominadas α_{1F} a α_{1I} , las cuales se agrupan en tres familias: 1) α_{1S} , α_{1C} , α_{1D} y α_{1F} ; 2) α_{1A} , α_{1B} y α_{1E} ; y 3) α_{1G} , α_{1H} y α_{1I} (Tabla 1). Estos nombres fueron otorgados de acuerdo con el gen que las codifica: CACNA1S, C, D, F, A, B, E, G, H e I (Lory, Ophoff et al. 1997); otras maneras se basan en la familia y el orden cronológico de su descubrimiento, la sensibilidad a una neurotoxina o el tipo de corriente del canal. La nomenclatura más reciente, aprobada por NC-IUPHAR (*Internacional Union of Basic and Clinical Pharmacology*) es conforme al esquema Cavx.y, en donde Cav hace alusión a los canales de calcio dependientes de voltaje, x al número designado inicialmente a la subfamilia del canal, es decir, tipo L, T, N, P/Q y R, e y es el número de los miembros individuales de cada subfamilia (Tabla 1) (Ertel, Campbell et al. 2000).

Tabla 1. Nomenclatura de los canales de calcio dependientes de voltaje, de acuerdo con los diferentes criterios. (Modificado de Rosich, 2008).

Canal (IUPHAR)	Subunidad	Tipo de canal (corriente)	Nomenclatura gen (HUGO)	Cromosoma
Cav1.1	α_{1S}	L	CACNA1S	1q32.1
Cav1.2	α_{1C}	L	CACNA1C	12p13.3
Cav1.3	α_{1D}	L	CACNA1D	3p14.3
Cav1.4	α_{1F}	L	CACNA1F	Xp11.23

Cav2.1	α_{1A}	P/Q	CACNA1A	19p13.1
Cav2.2	α_{1B}	N	CACNA1B	9q34.3
Cav2.3	α_{1E}	R	CACNA1E	1q25.3
Cav3.1	α_{1G}	T	CACNA1G	17q21.33
Cav3.2	α_{1H}	T	CACNA1H	16p13.3
Cav3.3	α_{1I}	T	CACNA1I	22q13.1

1.2.3 CLASIFICACIÓN DE LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE

Debido a sus características fisiológicas y farmacológicas, los CCDV se clasificaron inicialmente en dos grandes grupos: canales de alto umbral (*High Voltage Activated* HVA), que se activan a un voltaje alto de membrana (-40 mV a -10 mV); y los canales de bajo umbral (*Low Voltage Activated* LVA) o llamados tipo T, los cuales necesitan solo una pequeña despolarización para ser activados (-70 mV a -60 mV) (Llinas y Yarom 1981, Catterall 2011).

Los canales HVA, se encuentran de forma abundante en músculo esquelético, liso y cardiaco, así como en las neuronas. Su característica farmacológica es la sensibilidad a las 1,4-DHPs (dihidropiridinas), una clase amplia de fármacos con acción inhibitoria (nifedipina, nisoldipina, isradipina) o activadora (Bay K 8644) en el canal (Lacinova 2005).

Los canales tipo T fueron descritos en neuronas sensoriales de vertebrados (Carbone y Lux 1984), pero han sido encontrados en diversas células excitables y no excitables como en músculo liso y esquelético, fibroblastos, osteoblastos, astrocitos, etc., y se encuentran ausentes en células neuroendócrinas y simpáticas. Su función está relacionada con la actividad rítmica y la entrada de Ca^{2+} a

potenciales negativos (Bean 1985). En contraste con los canales tipo L, son resistentes a las dihidropiridinas y son bloqueados por sustancias como la amilorida (Tang, Presser et al. 1988), la tetrametrina (Hagiwara, Irisawa et al. 1988), la difenilhidantoina (Yaari, Hamon et al. 1987) y el octanol (Llinas, Sugimori et al. 1989).

Después de la descripción de los canales tipo L y T, en la década de 1980 experimentos en neuronas del ganglio de la raíz dorsal de pollo revelaron nuevos canales de calcio insensibles a las dihidropiridinas y con conductancias entre los canales L y T (Nowycky, Fox et al. 1985, Fox, Nowycky et al. 1987); estos canales fueron llamados tipo "N" (por la palabra neurona), los cuales son bloqueados por la ω -conotoxina, que se obtiene del veneno de caracoles marinos de género *Conus* (Martin-Moutot, Lang et al. 1995). Los canales tipo N se han identificado en altas cantidades en el hipocampo, corteza y cerebelo, principalmente en regiones con muchas sinapsis, ya que su función, al activarse por alto voltaje, es la de permitir la liberación de los neurotransmisores en ellas (Lacinova 2005).

Los canales tipo P/Q se describieron inicialmente en las células de Purkinje (Llinas, Sugimori et al. 1989). Los canales tipo P se activan a potenciales de membrana mayores a -50mV ; estos canales están implicados en diversos procesos, principalmente en la liberación de neurotransmisores en algunas sinapsis. En 1995 se describieron los canales tipo Q, los cuales fueron identificados en neuronas granulares del cerebelo, y presentan una cinética de inactivación más rápida que los tipo P (Randall y Tsien 1995). Los canales tipo P/Q se caracterizan por su sensibilidad al veneno de la araña *Agelenopsis aperta*, la ω -Agatoxina, y además son codificados por el gen CACNA1A, se expresan principalmente en las neuronas del sistema nervioso central (SNC) y se localizan en áreas ricas en terminales sinápticas, específicamente en la capa molecular del cerebelo y la zona del hipocampo CA3 (Hillman, Chen et al. 1991, Catterall, Perez-Reyes et al. 2005). También se sabe que actúan como reguladores de la liberación de

neurotransmisores y la integración neuronal, esto en las terminaciones nerviosas y dendritas (Cornet, Bichet et al. 2002).

Los canales tipo R toman su nombre por la palabra “resistente”, debido a que ninguna de las toxinas a las cuales fueron sensibles los canales tipo N y P/Q, ejercía algún efecto en estos canales. Se localizan en cuerpos neuronales y dendritas del globo pálido, tálamo, amígdala anterior, hipotálamo, y núcleos subtalámicos. Su función es producir descargas repetitivas (Rosich 2008).

Los diferentes tipos de canales de calcio fueron definidos principalmente por las subunidades α_1 , y hasta la fecha diez diferentes se han caracterizado en los mamíferos por la clonación de sus ADNc y la expresión funcional en células de mamífero o en ovocitos de *Xenopus*. Estas subunidades, por sus características estructurales y funcionales, fueron divididas en tres familias: Cav1, Cav2 y Cav3 (Catterall 2011).

Las corrientes de calcio tipo L están mediadas por los canales formados por las subunidades α_1 de la familia tipo Cav1, y presentan alrededor del 75% de identidad de la secuencia de aminoácidos entre ellos. Los canales de tipo Cav2 forman una familia distinta con una identidad de secuencia de aminoácidos menor del 40% con Cav1, pero más del 70% de identidad de secuencia de aminoácidos entre sí. Las subunidades clonadas de Cav2.1 conducen corrientes de calcio de tipo P/Q. Las subunidades Cav2.2 conducen corrientes de calcio de tipo N y las subunidades Cav2.3 conducen corrientes tipo R (Soong, Stea et al. 1993).

Los canales de calcio de tipo T se denominaron originalmente canales de bajo umbral (LVA) ya que pueden ser activados por despolarizaciones pequeñas de la membrana plasmática. En muchas neuronas, la afluencia de calcio a través de los canales LVA desencadena espigas de bajo umbral, lo que a su vez desencadena una ráfaga de potenciales de acción mediados por el Na^+ . Se cree que el disparo de la ráfaga juega un papel importante en la actividad sincronizada del tálamo, así

también, la entrada de Ca^{2+} a través de los canales tipo T puede regular directamente las concentraciones de Ca^{2+} intracelular. La secuencia de aminoácidos de estos canales muestra una estructura similar a la encontrada en canales HVA y canales de Na^+ , lo que indica que están relacionados evolutivamente (Figura 3). Las actividades electrofisiológicas de los canales Ca_v3 se diferencian de los canales HVA por su activación a voltajes más bajos, una inactivación más rápida, una desactivación más lenta y una menor conductancia de Ba^+ (Perez-Reyes 2003). Estas subunidades están relacionadas distantemente con otros homólogos conocidos, con menos del 25% de identidad en los aminoácidos. Estos resultados revelan una sorprendente dicotomía estructural entre los canales de calcio LVA y HVA. Es evidente que estos dos linajes de canales de calcio divergieron muy temprano en la evolución de los organismos multicelulares (Figura 3). Representantes únicos de las subfamilias Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3 están presentes en genomas de invertebrados como el nematodo *Caenorhabditis elegans* y la mosca de la fruta *Drosophila* (Catterall 2011).

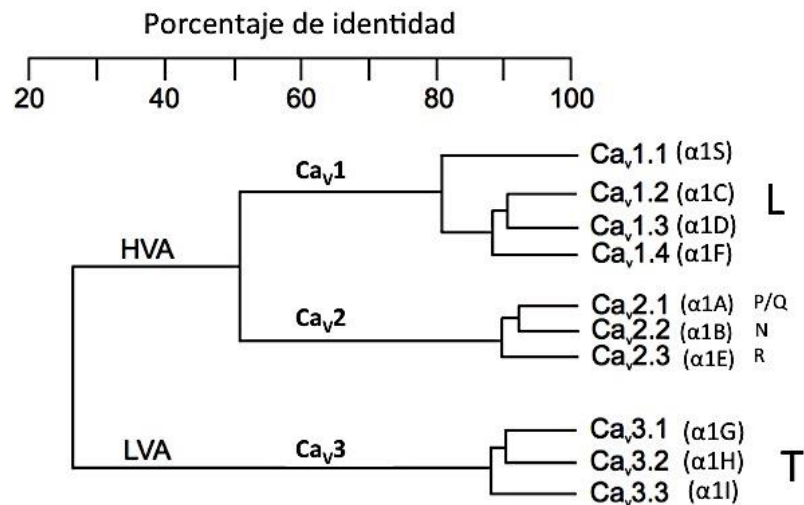


Figura 3. Representación filogenética de las secuencias de aminoácidos primarias de los canales de calcio. Se compara los segmentos transmembranales y las asas del poro. La comparación de las secuencias de aminoácidos de los canales de calcio de forma individual reveló una relación evolutiva entre las clases de canales. Un evento evolutivo temprano separó las subunidades α_1 en canales LVA y HVA, con menos del 30% de homología en la secuencia. Un evento evolutivo posterior divide los canales HVA en dos familias: tipo L y tipo N, con homología de secuencia de alrededor del 50%. Los miembros individuales de ambas familias comparten más del 80% de homología de secuencia. Eventualmente todas las subunidades α_1 conocidas tienen más variantes de empalme (splicing alternativo). Éstas comparten usualmente más del 95% de homología en las secuencias de forma individual. (Modificado de Lacinova 2005).

1.3 CANALES DE CALCIO DE LA FAMILIA Cav2

Los canales de la familia Cav2 tienen una expresión muy importante en el sistema nervioso de los cordados; se encuentran en células neuronales y terminaciones sinápticas, donde inician el proceso de neurotransmisión en la sinapsis química, como las ejercidas por el glutamato, la acetilcolina, el GABA y la glicina, y median la entrada de Ca_{2+} al soma y a las dendritas (Ishikawa, Kaneko et al. 2005). Los canales Cav2.1, Cav2.2 y en menor medida Cav2.3 son los principales responsables, en el sistema nervioso central de los vertebrados, de la rápida liberación de los neurotransmisores para transferir la información entre las neuronas. Los canales Cav2.2 que conducen las corrientes de calcio tipo N son las más importantes en la sinapsis de neuronas del sistema nervioso periférico, en contraste con los canales Cav2.1 que conducen corrientes de calcio de tipo P/Q y juegan un rol mayor en la sinapsis de neuronas que forman el sistema nervioso central de los mamíferos (Catterall y Few 2008). Estos canales poseen sitios específicos asociados al mecanismo de liberación de los neurotransmisores y a la alta eficiencia de este proceso, como el sitio de interacción (synprint) con proteínas sinápticas, el cual se encuentra en el asa entre los dominios II y III. En las terminales nerviosas forma un complejo con las proteínas SNARE (*Soluble NFS Attachment Protein Receptor*) esenciales para la fusión de las vesículas a la membrana presináptica. El sitio synprint consiste en dos microdominios separados por un eslabón flexible, los cuales se unen de forma específica e independiente a la sintaxina-A1 y a la SNAP-25; el Ca_{2+} que entra a través de los canales de calcio dependientes del voltaje, sobre todo de los Cav2.1 y Cav2.2, se une a una proteína vesicular llamada sinaptotagmina-1, la cual presenta dos dominios de unión a Ca_{2+} que le permiten insertarse a la membrana y asociarse con los canales de Ca_{2+} . La sinaptotagmina-1 aparentemente sincroniza la fusión de las vesículas a la membrana presináptica para la liberación simultánea del neurotransmisor a la hendidura sináptica. Además, existen en las vesículas asociadas a ellas, proteínas como Rim-1 (*Rab-3 interacting molecule*), CSP (*Cysteine String Proteins*) y Munc-18, que modulan la actividad de los canales de forma directa para ajustar la

liberación de los neurotransmisores a las diferentes condiciones fisiológicas (Figura 4) (Sudhof 2004, Catterall y Few 2008, Sudhof 2013).

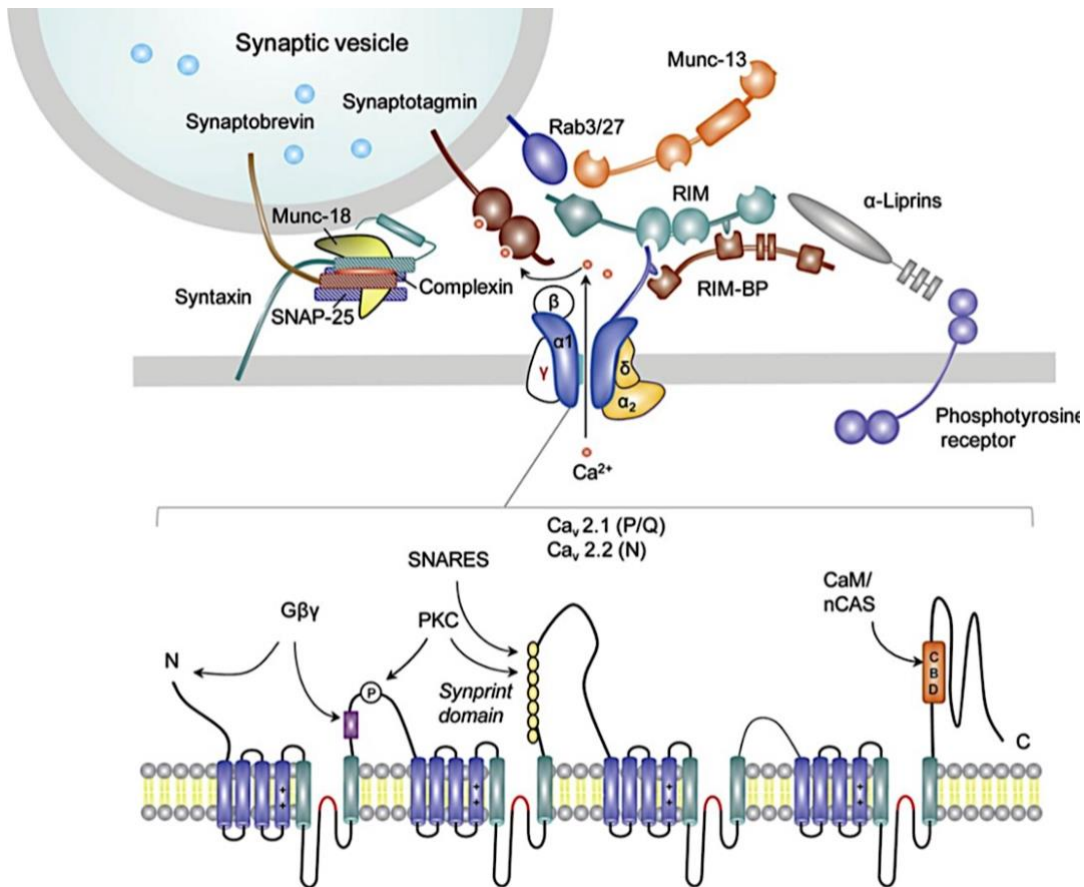


Figura 4. Complejo de proteínas implicadas en la exocitosis de vesículas sinápticas. Las SNAREs neuronales consisten en las proteínas syntaxina y SNAP-25 en la membrana plasmática, y la sinaptobrevina en la membrana vesicular. La fusión vesicular está liderada por la familia de proteínas Rab, precisamente la proteína Rab3, la cual unida a GTP se inserta en la membrana vesicular y reconoce un complejo proteico efector en la membrana plasmática presináptica denominado RIM (Rab interacting molecule). Una vez que las vesículas han sido ancladas en las zonas activas deben ser transformadas en vesículas que están listas para liberarse, en donde están implicadas al menos tres proteínas: RIM, Munc-13 y Munc-18. La complexina es una proteína mediadora de la activación del complejo SNARE. Se muestra en la membrana plasmática una proteína α -Liprin que funciona con la fosfotirosina, implicadas en las interacciones célula-matriz (Serra-Pages, Medley et al. 1998). Se muestra la unión de la calmodulina y proteínas G, otros mecanismos de interacción de los canales de calcio dependientes del voltaje con otras proteínas. (Tomado de Sudhof 2013).

Los canales Cav2.1 y Cav2.2 también son modulados por su interacción con las subunidades β/γ de las proteínas G (Figura 5); estos receptores, en general, modulan negativamente la actividad de los canales de calcio de la familia Cav2, y en consecuencia, reducen la liberación de neurotransmisores tanto excitadores

como inhibidores, contribuyendo así a la modulación de la activación neuronal (Catterall y Few 2008, Lopez 2015). La unión del agonista al GPCR (receptores acoplados a proteínas G o *G-protein coupled receptors*) cataliza el intercambio de GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$ provocando cambios en su conformación que desencadena la disociación del monómero $G\alpha$ de $G\beta\gamma$ (Venkatakrisshnan, Deupi et al. 2013). Así, las subunidades $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ liberadas son capaces de activar diversas cascadas de señalización intracelular y modular múltiples efectores intracelulares, como los Cav2 pre-sinápticos (Figura 5) (Zamponi y Currie 2013).

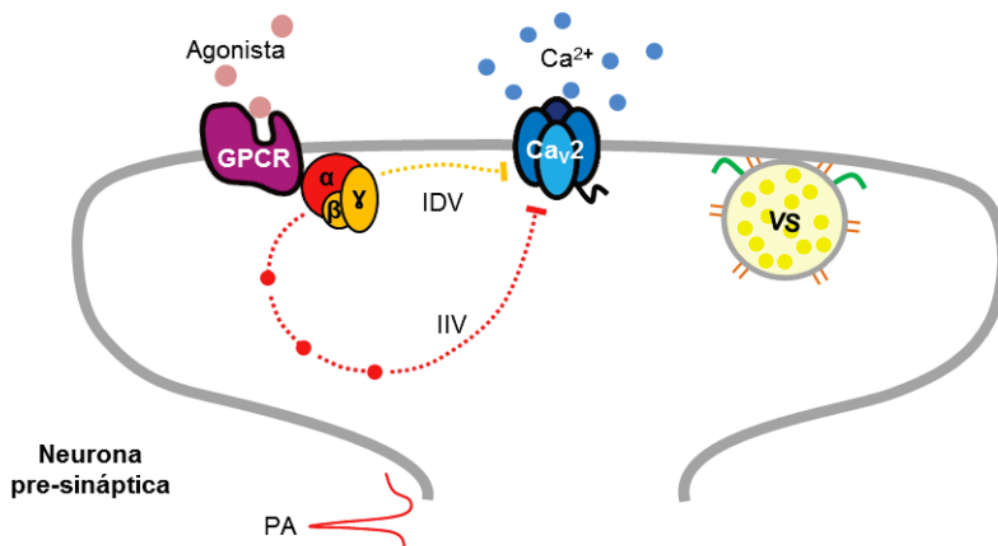


Figura 5. Modulación de los canales de calcio dependientes de voltaje de la familia Cav2 presinápticos por GPCR. Cuando el agonista se une a su GPCR, activa la proteína G a la cual se acopla, pudiendo inhibir por dos mecanismos distintos la actividad de los canales Cav2. Las subunidades β/γ de la proteína G se unen directamente al canal provocando una inhibición dependiente del voltaje (IDV), mientras que la subunidad α provoca una inhibición independiente del voltaje (IIV) que involucra diferentes mediadores dependiendo el tipo de subunidad α activada. Así, tras la llegada de potenciales de acción (PA), los Cav2 de la neurona pre-sináptica permiten un ingreso del ion calcio al citoplasma y consecuentemente se disminuye la liberación de los neurotransmisores contenidos en las vesículas sinápticas (VS) al espacio sináptico (Tomado de Lopez 2015).

La calmodulina (CAM) es una proteína citosólica, ampliamente distribuida que contiene cuatro sitios de unión al calcio. La unión del Ca^{2+} a la CAM provoca un cambio conformacional que le permite unirse a varias proteínas diana y de ese modo cambiar de estado activo a inactivo, es decir, funcionan como interruptores y trabajan en conjunto para modular la actividad de otras proteínas (Lodish 2012). Los

canales tipo P/Q están regulados por la unión del Ca^{2+} y la CAM en el carboxilo terminal del dominio IQ de los canales Cav1.2 (Figura 6). Este dominio está involucrado en la inactivación de la corriente de calcio; la CAM se puede unir a esta región del canal cuando la concentración de calcio intracelular es baja; y por otro lado, en respuesta a impulsos constantes, lo cual genera la acumulación de calcio en el citoplasma; esta proteína regula la inactivación dependiente de calcio, lo cual hace que la corriente se inactive más rápido que en presencia de bario. Este mecanismo de regulación por CAM parece determinar la disponibilidad de canales funcionales en función de la concentración de calcio y de la frecuencia con la que se despolariza la membrana (Lee, Wong et al. 1999).

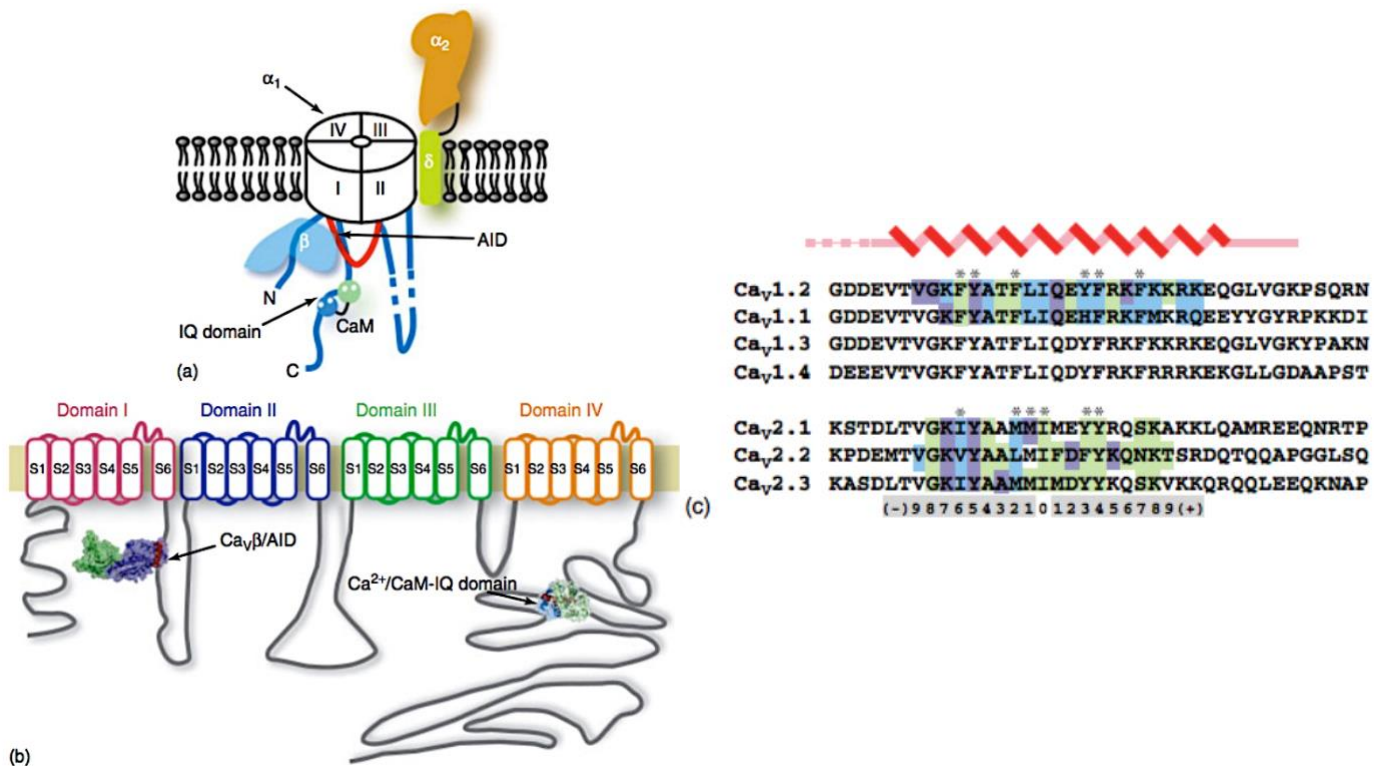


Figura 6. Comparación de los dominios IQ de calmodulina en canales de calcio dependiente de voltaje. A) Diagrama de un canal de calcio Cav2 o Cav1. Se muestra un sitio de unión de alta afinidad entre los dominios I-II conocido como el dominio de interacción alfa (AID). La CAM se muestra unida al extremo C-terminal de la cola citoplasmática en el sitio del dominio IQ. Las subunidades asociadas a la membrana se muestran en naranja y verde ($\text{Cav}\alpha_2\delta$). B) Topología de la unidad formadora del poro del canal Cav1, mostrando las posiciones del complejo $\text{Cav}\beta/\text{AID}$ y el dominio $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -IQ. C) Comparación de las secuencias del dominio IQ de los canales Cav2 y Cav1. Las posiciones de las anclas principales se indican con asteriscos. Los colores indican contactos con el lóbulo N (verde), el lóbulo C (azul) o ambos (morado) (Tomado de Kim 2010).

1.4 CANALOPATÍAS DE LA FAMILIA CAV2

Las canalopatías pueden originarse por dos tipos de mecanismos: las alteraciones genéticas y las enfermedades autoinmunes. Dentro de las alteraciones genéticas se encuentran las mutaciones que se presentan en la región codificante del gen para un canal iónico; estas mutaciones producen cadenas polipeptídicas que no son procesadas correctamente, o no se incorporan a la membrana plasmática, o que al acoplarse las subunidades y formar los canales, éstos no son funcionales. Otra posibilidad frecuente es que, aun siendo canales funcionales, presenten propiedades biofísicas alteradas. Cualquiera que sea el caso, llevan a la ganancia o pérdida de la función del canal. Dentro de las alteraciones genéticas es posible también que se presenten mutaciones en la región promotora del gen que codifica para un canal iónico; esto puede causar sub-expresión o sobreexpresión de la proteína canal produciendo cambios en el número de canales, es decir, un aumento o disminución de la función. Como tercer tipo de alteración genética que determina la disfunción se encuentran las mutaciones en los genes que codifican para moléculas reguladoras de los canales iónicos, ya sea por defectos en su estructura o por defectos en las rutas que llevan a su producción.

Por otro lado, las enfermedades autoinmunes pueden ser causantes de canalopatías ya que los anticuerpos para las proteínas canal pueden disminuir o aumentar la función del canal como en la enfermedad *miastenia gravis* (Martínez Rosas 2004).

Las subunidades α_1 formadoras de poros, contienen la maquinaria biofísica esencial que controla el flujo de calcio en respuesta a la despolarización de la célula. En combinación con las subunidades auxiliares, forman complejos de poro del canal que son fundamentales para la fisiología y farmacología de células diversas, que van desde los espermatozoides hasta las neuronas. Las mutaciones en los complejos del poro generan diversas patologías, que van desde fallos en el acoplamiento excitación-contracción hasta la ceguera nocturna (Tabla 2) (Martínez Rosas 2004, McKeown, Robinson et al. 2006). Varios trastornos neurológicos

heredados son causados por mutaciones en genes que codifican para subunidades de canales de calcio dependientes de voltaje, éstas han sido identificadas principalmente en el sistema nervioso central de humano y ratón (Pietrobon 2002).

Tabla 2. Enfermedades relacionadas con alteraciones genéticas en canales de calcio dependientes de voltaje. (Tomado de Martínez Rosas 2004).

Canal iónico	Gen	Subunidad afectada/ligando	Enfermedad
Cav1.1	CACNA1S	α	Parálisis periódica hipokalémica; hipertermia maligna.
Cav1.4	CACNA1F	α	Ceguera nocturna estacionaria congénita vinculada al cromósoma X.
Cav2.1	CACNA1A	α	Migraña familiar hemipléjica; ataxia episódica; ataxia espinocerebelosa tipo 6.

Los canales de calcio tipo P/Q son unos de los más abundantemente expresados en el sistema nervioso central de los mamíferos, además de ser expresados en muchos cuerpos celulares y dendritas; están altamente localizados en las terminales presinápticas en todo el cerebro y columna vertebral, acoplado la excitación neuronal a la secreción del neurotransmisor. El poro conductor de iones está formado por cuatro dominios de la subunidad α_{1A} , mientras que las subunidades accesorias (β , $\alpha_{2\delta}$) modulan la cinética del canal y el nivel de expresión (Nimmrich y Gross 2012). Teniendo en cuenta esto, no es inesperado que las mutaciones en el gen CACNA1A que codifica para la subunidad del canal Cav2.1 causan varias canalopatías graves. Estas mutaciones están asociadas con desórdenes neurológicos en humanos como la migraña familiar hemipléjica, ataxia episódica y la ataxia espinocerebelosa tipo 6, y en ratones desórdenes cambiantes que los hacen perder el equilibrio. Además de las mutaciones definidas en el canal Cav2.1 que causan un ataque autoinmune, estos canales se asocian con el síndrome de Lambert-Eaton Miasténico (LEMS) (Adams y Snutch 2007).

Los canales de tipo P/Q están altamente expresados en las neuronas presinápticas, donde están críticamente envueltas en la neurotransmisión sináptica y ejercen una gran influencia en la excitabilidad neuronal (Evans y Zamponi 2006). Mutaciones en CACNA1A (gen que codifica para la subunidad Cav2.1) han sido identificadas en algunos casos de epilepsia en humanos, presentando episodios de ataxia tipo 2 y

coordinación muscular pobre, además de migraña (Jouvenceau, Eunson et al. 2001, Imbrici, Jaffe et al. 2004, Guerin, Feigenbaum et al. 2008).

La migraña hemipléjica familiar tipo 1 (FHM-1) se caracteriza por dolores de cabeza que debilitan la condición neurológica-vascular en donde el que la padece sufre de dolores muy intensos solos o en asociación con aura (visual o auditiva) y en algunos casos parálisis. La FHM-1 es un desorden autosómico dominante hereditario donde el fenotipo neuronal incluye una ola de hiper excitabilidad seguida por la depresión de larga duración de la actividad que se propaga a través de la corteza a lo largo de unas pocas decenas de minutos (conocida como depresión cortical propagada CSD). Se cree que la participación del sistema vascular trigeminal juega un papel clave en los aspectos dolorosos de la migraña (Pietrobon 2002). Aproximadamente el 50% de los pacientes con FHM-1 poseen mutaciones en el gen CACNA1A que codifica para la subunidad Cav2.1 del canal de calcio tipo P/Q (Ophoff, Terwindt et al. 1996).

Otro desorden que envuelven las mutaciones en el gen CACNA1A es la Ataxia Episódica tipo 2 (EA2) en donde los pacientes sufren fuertes ataques por la coordinación pobre de los músculos que pueden durar unas horas o varios días a pesar de administrar tratamientos como el inhibidor de la anhidraza carbónica, acetazolamida (Jen, Kim et al. 2004). Una docena de mutaciones en el gen CACNA1A han sido identificadas en pacientes con EA2, así como en algunos ratones con rasgos típicos de este desorden. Varias mutaciones están localizadas en regiones transmembranales e intracelulares de la subunidad Cav2.1 y no tienen sentido o introducen codones de paro prematuros (Adams y Snutch 2007, Pietrobon 2010). Los efectos de estas mutaciones implican una pérdida de función parcial o total, ya sea en la disminución de expresión del canal que se predice como resultado del mal plegamiento de la proteína y del transporte a la membrana plasmática y/o cambios en el umbral de voltaje para la activación (Wan, Khanna et al. 2005, Adams y Snutch 2007, Jeng, Sun et al. 2008, Mezghrani, Monteil et al. 2008).

La Ataxia Espinocerebelar tipo 6 también es atribuida a mutaciones en los canales Cav1.2, en donde los pacientes sufren de atrofia cerebelar, pérdida del movimiento y desordenes en la coordinación, pérdida de propiocepción y movimiento de ojos

involuntarios (Zhuchenko, Bailey et al. 1997). Investigaciones genéticas revelan que se incrementa el número de repeticiones de CAG en el exón 47 del gen CACNA1A (Restituito, Thompson et al. 2000).

Los canales Cav2.2 tiene un papel importante en la liberación de los neurotransmisores, sin embargo, no se han identificado mutaciones en el gen CACNA1B en la población humana. Con estudios basados en ratones *knockout* se puede anticipar problemas en la nocicepción, disminución de la función del sistema nervios simpático y alteraciones en respuesta al etanol y a anestésicos (McKeown, Robinson et al. 2006).

Los canales Cav2.3 se localizan principalmente en las dendritas y cuerpos somáticos de las neuronas centrales y podrían participar en la liberación del neurotransmisor, aunque no se han identificado mutaciones en el gen CACNA1E en humanos. Observaciones en ratones *knockout* indican que el deterioro de estos canales afecta probablemente las células beta pancreáticas facilitando la entrada global de calcio necesaria para el reabastecimiento de gránulos (Jing, Li et al. 2005, McKeown, Robinson et al. 2006).

1.5 LA TORTUGA COMO MODELO PARA ESTUDIAR LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE

Actualmente se utilizan a las tortugas como modelo de estudio para la neurobiología ya que se ha descubierto que varias especies son tolerantes a la hipoxia, es decir, un estado de deficiencia de oxígeno en la sangre, células y tejidos del organismo. Por ejemplo, la tortuga *Chrysemys picta* puede sobrevivir a la anoxia (ausencia total de oxígeno en sangre y tejidos) durante 5 meses a 1–3 °C durante la inactividad de invierno (Bickler y Donohoe 2002). La tortuga de agua dulce *Trachemys scripta* puede soportar anoxia durante días a temperatura ambiente (Lutz y Milton 2004). Investigaciones muestran que esta capacidad no es simplemente una de tolerancia pasiva, sino que se debe a un conjunto de adaptaciones que producen un estado

de profundo hipo metabolismo, la más eficaz de todas las estrategias de defensa contra la hipoxia (Hochachka y Lutz 2001).

El cerebro de tortuga tiene concentraciones de glucógeno alrededor de cinco veces mayor que el de la rata o de la trucha arcoíris, los cuales son anoxia-intolerantes, esto proporciona un almacén inmediatamente accesible de la glucosa para la glucólisis anaeróbica hasta que un suministro adecuado de glucosa es liberado a partir de las reservas del hígado. La tortuga tiene mucho más baja actividad enzimática aeróbica y densidades de canales iónicos que los mamíferos, diferencias que coinciden con los niveles de sus intensidades metabólicas (Lutz y Milton 2004).

Bickler en 1992 realizó un estudio donde investigó los mecanismos de la anoxia cerebral, la concentración de calcio intracelular cerebro cortical y la regulación del pH comparando tortugas (*T. scripta*) y ratas de laboratorio. En exposición a la anoxia, la concentración de calcio intracelular aumentó en el cerebro de rata, pero en la tortuga la concentración de calcio era normal, incluso después de un mayor tiempo de exposición, así como los niveles de ATP en las tortugas anóxicas se mantuvieron normales, pero cayeron rápidamente en ratas. Esto indica que la tolerancia de la anoxia cerebral en tortugas puede estar relacionada con la producción anaeróbica de ATP, la detención de los canales de calcio y la atenuación de los cambios en el pH.

La tortuga también se utiliza como objeto de estudio en las investigaciones de regeneración de médula espinal, como la tortuga *Trachemys dorbigny*, que luego de una lesión severa de su médula espinal, puede regenerar los tejidos que rodean la lesión y reconectar los circuitos neuronales necesarios para mover los miembros afectados, esto por la activación de células progenitoras que reparan el daño (Russo 2014).

Las tortugas, en especial *C. picta*, por ser modelos de estudio son representantes de un clado de vertebrados cuya biología y posición filogenética nos ayudan con la comprensión de aspectos fundamentales de la evolución de los vertebrados. La investigación ecológica y fisiológica extensa puede colocar los nuevos avances de la investigación en genética evolutiva, la genómica, la biología del desarrollo

evolutivo, contribuyendo a los recursos actuales, tales como una biblioteca de cromosomas artificiales bacterianos (BAC) de *C. picta*, secuencias del genoma y las bibliotecas de ADNc. Este enfoque integrador permite a la comunidad de investigadores dar explicaciones funcionales y evolutivas para el estudio de los rasgos biológicos que se encuentran no solo entre los reptiles, sino en general en los vertebrados. Por otra parte, los seres humanos y los reptiles comparten un ancestro común, y dada la facilidad del uso de los vertebrados no placentarios en biología experimental en comparación con los embriones de mamíferos, las tortugas son también un modelo emergente para la investigación biomédica. Por ejemplo, las tortugas *C. picta* han sido estudiadas para entender muchas respuestas biológicas a la hibernación y anoxia, como centinelas potenciales para xenobióticos ambientales, y como modelo para descifrar la ecología y la evolución del desarrollo sexual y la reproducción. Por lo tanto, son un excelente sistema modelo para estudios de reptil con la salud humana, ambiental, ecológica y significado evolutivo.

En un estudio sobre la presencia de canales LVA en las neuronas motoras de animales adultos, se utilizaron tortugas adultas de la especie *T. scripta elegans* por ser un modelo de estudio mucho más resistente a la hipoxia que las preparaciones microscópicas de la médula espinal de roedores, mostrando la evidencia de que canales de la familia Cav3 están presentes en la médula espinal de los animales adultos y que estos canales pueden contribuir a determinar la excitabilidad de las neuronas motoras (Canto-Bustos, Loeza-Alcocer et al. 2014).

En la tortuga *T. scripta elegans* se ha mostrado la presencia de los canales N y P/Q en moto neuronas invadidas por las fibras provenientes del funículo dorso lateral (Castro, Aguilar et al. 2007) y además, utilizando bloqueadores específicos para los canales de calcio, se sabe que ambos tipos de canales N y P/Q están implicados en la liberación de los neurotransmisores en las tortugas, pero que solo los canales tipo N están implicados en la modulación presináptica por receptores GABA_B en la sinapsis corticoestriatal de la tortuga (Sánchez-Mejorada et al., 2009). Esta situación contrasta de forma notable con lo que sucede en los mamíferos, donde de igual

forma ambos tipos de canales están involucrados en la liberación de los neurotransmisores, pero los canales modulados son los P/Q (Barral, Toro et al. 2000).

La modulación de la actividad de los canales de calcio dependientes de voltaje de la familia Cav2 en la tortuga con respecto a la rata no puede ser comparada por su expresión heteróloga, debido a la falta de secuencias codificantes de los canales de calcio en la tortuga. Como ya antes se dijo, la tortuga se ha utilizado como modelo para estudios en neurociencias y otras áreas, por las ventajas fisiológicas con respecto a otros vertebrados, sin embargo, el no conocer el funcionamiento molecular de las proteínas canales dentro del sistema nervioso de estos organismos dificulta el empleo de los mismos en estudios de investigación.

Los estudios de caracterización molecular, funcional y farmacológica de los CCDV en los vertebrados se han realizado principalmente en mamíferos y peces, y en menor escala en el resto de los grupos. En una búsqueda reciente de secuencias depositadas en la base de datos NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) empleando como palabras clave “canales iónicos” y “voltaje”, se encontraron resultados que confirman lo antes dicho. Por estas razones, es necesario una caracterización molecular y biofísica más completa de los CCDV en ese tipo de organismos, por lo cual el presente trabajo tiene como objetivo la clonación parcial de regiones de los CCDV de la familia Cav2 de la tortuga *T. scripta elegans*, un organismo perteneciente al grupo de los reptiles y que, por causa de su crianza artificial, no está considerado en peligro de extinción como otros.

II. HIPÓTESIS

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de la familia Cav2 presentes en el tejido nervioso de la tortuga presentan la misma secuencia que en los mamíferos, pero exhiben características biofísicas, farmacológicas y estructurales diferentes que los hacen útiles para entender la diversificación de las funciones que este grupo de proteínas tiene en el sistema nervioso de los vertebrados.

III. OBJETIVOS

3.1 GENERAL

- Clonar parcialmente los ADNc de los canales de calcio dependientes de voltaje de la familia Cav2 de la tortuga *T. scripta elegans*.

3.2 PARTICULARES

- Diseñar oligonucleótidos degenerados en regiones conservadas de las tres isoformas de los canales de calcio dependientes de voltaje de la familia Cav2 de la tortuga *T. scripta elegans*.
- Diseñar oligonucleótidos específicos para amplificar regiones de la subunidad α_1 de los canales de calcio dependientes del voltaje de la familia Cav2 de la tortuga *T. scripta elegans*.
- Amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la transcripción en reversa, regiones de los canales de calcio dependientes del voltaje de la familia Cav2 de la tortuga *T. scripta elegans*.
- Clonar y caracterizar por análisis de restricción y secuenciación, las regiones amplificadas de los canales de calcio dependientes del voltaje de la familia Cav2 de la tortuga *T. scripta elegans*.
- Comparar las secuencias de aminoácidos, deducidas a partir de las regiones amplificadas de los ADNc de los canales de calcio dependientes del voltaje

de la familia Cav2 de la tortuga *T. scripta elegans*, con las ya reportadas de otras especies, principalmente de vertebrados.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Diseño de oligonucleótidos degenerados

A partir del análisis y comparación múltiple de secuencias de aminoácidos de los canales de Ca²⁺ de la familia Cav2 de otros grupos de vertebrados, principalmente mamíferos, previamente se diseñaron oligonucleótidos degenerados mediante la estrategia CODEHOP (*Consensus-Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primer*) basada en primers oligonucleótidos híbridos degenerados por consenso. Un oligonucleótido degenerado consiste en un conjunto de primers que contienen cada uno una secuencia diferente en la región central de 30 degenerados, donde cada primer proporciona una de las posibles combinaciones de codones que codifican un motivo de 3 a 4 aminoácidos conservados dentro del bloque de la secuencia (Rose, Henikoff et al. 2003).

Estos oligonucleótidos permitieron amplificar mediante la RT-PCR, a partir de ARN de cerebro de tortuga, fragmentos de aproximadamente 350 pb (Moreno 2016). Con base en estas secuencias se diseñaron oligonucleótidos degenerados para amplificar fragmentos de ~1,500 pb. Los oligonucleótidos degenerados se diseñaron con las características especificadas en la Tabla 3.

Tabla 3. Especificaciones de los oligonucleótidos degenerados (cacnf4, cacnf1 y cacnr2) utilizados para amplificar los ADNc de los canales de calcio de la familia Cav2 de la tortuga *T. scripta elegans*.

Nombre	Sentido	Secuencia (5´-3´)	GC (%)	Tm (°C)	Longitud (pb)
cacnf4	Sentido (forward)	GCGCCTACTTCCGGGAYBTNTGGAA	52	63.6	25
cacnf1	Sentido (forward)	TGATCGCCATGCTGTTCTTYATHAYGC	39.29	60.2	28
cacnr2	Antisentido (reverse)	CCCGGGTCAGGTACTCGAARTTRTCCAT	50	63	28

Nota: N= cualquier nucleótido; R= A o G; Y= C o T; H= Cualquiera excepto G; B= Cualquiera excepto A.

4.2 Síntesis del ADNc a partir del ARN total del cerebro de la tortuga *T. scripta elegans*.

El ADNc se obtuvo mediante la transcripción en reversa (RT) utilizando como molde el ARN total del cerebro de tortuga (previamente extraído por Moreno, 2016). Se empleó la enzima transcriptasa reversa ProtoScript II (*New England Biolabs, Ipswich, MA*), dodecámeros al azar (dN₁₂, concentración final 6 μM) y el oligonucleótido linker-dT (CCTAGGTCGACCGGTGATGAATTC[T]₁₈, concentración final 5 μM) (Figura 7). El volumen final de la reacción fue de 20 μL. Inicialmente se mezclaron 2 μg de ARN total del cerebro de tortuga (640 ng/μL), el oligonucleótido linker-dT, los dodecámeros al azar, 1 μL de dNTPs 10 mM y agua libre de ARNsas suficiente para un volumen de 11 μL. Esta mezcla inicial se incubó a 70 °C por 5 min y posteriormente se enfrió rápidamente a 4 °C. En seguida se añadieron 4 μL de regulador de reacción 5×, 1 μL de inhibidor placentario de ARNasa (RNasin, 20 U/μL), 2 μL de transcriptasa reversa ProtoScript II (40 U/μL) y 2 μL de DTT 10 mM. Al final, el volumen de la reacción se ajustó a 100 μL con agua libre de ARNsas y se mantuvo a -20 °C hasta su uso.



Figura 7. Esquema de la síntesis del ADNc de los canales de Ca₂₊ de la familia Cav2 del cerebro de tortuga utilizando el oligonucleótido linker-dT. Este oligonucleótido presenta varios sitios de restricción en su extremo 5' (R1-R3) y una cadena de poli-dT en su extremo 3', que se hibrida con las bases de la cadena poli-A del extremo 3' de los ARNm.

4.3 Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa de los fragmentos de ADNc utilizando los oligonucleótidos degenerados.

La amplificación por la PCR de los fragmentos de ADNc de los canales de calcio Cav2 del cerebro de tortuga se realizó utilizando los oligonucleótidos degenerados nombrados cacnf4, cacnf1 y cacnr2 (Figura 8). Para esto se utilizó una polimerasa

de ADN de alta fidelidad (Q5 DNA polymerase, New England Biolabs, Ipswich, MA). Las condiciones de la reacción, que se realizó en un volumen final de 25 μL , fueron: regulador para polimerasa Q5 con MgCl_2 1 \times ; dNTPs 0.2 mM c/u; oligonucleótidos en sentido y antisentido 0.4 μM c/u; polimerasa de ADN Q5 0.5 U; ADNc del cerebro de tortuga 5 μL (Tabla 4).

Tabla 4. Composición de la mezcla de amplificación por PCR RACE con los oligonucleótidos *cacnf4*, *cacnf1* y *cacnr2*.

Componentes de la amplificación	Volumen
H₂O	10.75 μL
Regulador para polimerasa Q5 con MgCl₂ (5\times)	5 μL
dNTPs (5 mM c/u)	1 μL
<i>cacnr2</i> (10 μM)	1 μL
Q5 ADN polimerasa (2 U/μL)	0.25 μL
<i>cacnf4</i> (10 μM)	1 μL (Reacción 1)
<i>cacnf1</i> (10 μM)	1 μL (Reacción 2)
Molde (ADNc)	5 μL

Las condiciones de las amplificaciones fueron las siguientes: I) 95 $^{\circ}\text{C}/2$ min; II) 95 $^{\circ}\text{C}/30$ s; 55 $^{\circ}\text{C}/30$ s; 72 $^{\circ}\text{C}/1.5$ min; 15 ciclos; III) 95 $^{\circ}\text{C}/30$ s; 45 $^{\circ}\text{C}/30$ s; 72 $^{\circ}\text{C}/1.5$ min; 20 ciclos; IV) 72 $^{\circ}\text{C}/5$ min.

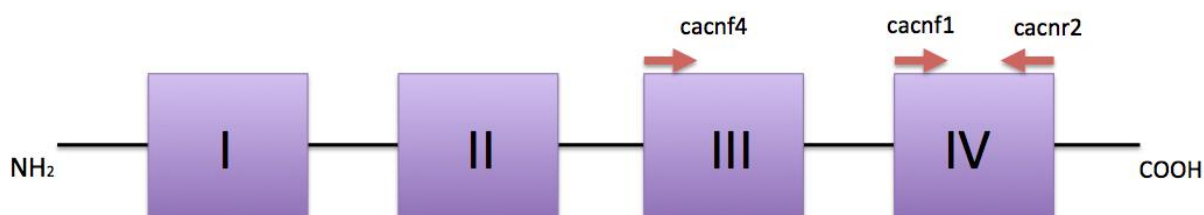


Figura 8. Esquema del sitio de unión de los oligonucleótidos *cacnf4*, *cacnf1* y *cacnr2* utilizados en la amplificación del fragmento dentro de los dominios III y IV del canal de Ca^{2+} . Se muestran en color púrpura los cuatro dominios del canal de Ca^{2+} de la familia Ca_v2 del cerebro de la tortuga *T. scripta elegans*; las flechas en color rojo representan la posición aproximada de los oligonucleótidos y el sentido en el que están.

4.4 Electroforesis en gel de agarosa

Los amplicones resultantes se resolvieron en geles de agarosa al 1% preparados en regulador TBE 0.75 \times , a los que se les agregó bromuro de etidio (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

para la tinción del ADN. La solución se vertió en un molde con un peine formador de pozos. Una vez que el gel se polimerizó se transfirió a una cámara de electroforesis al que se le agregó regulador TBE 0.75×. Las muestras de ADN amplificadas se mezclaron con regulador de carga 6× (30% glicerol, 0.25% azul de bromofenol y 0.25% xilen-cianol) y se cargaron dentro de los pozos, incluyendo los marcadores de peso molecular correspondientes. La separación de los fragmentos se realizó a un voltaje constante de 75 V por aproximadamente 70 min.

Los fragmentos de ADN en el gel fueron detectados con un equipo transiluminador de luz ultravioleta Gel Doc™ EZ (BioRad, Hercules, CA) con un tiempo de exposición de 0.2 s. Las imágenes fueron procesadas mediante el software Image Lab (BioRad Hercules CA).

4.5 Purificación de los fragmentos amplificados de ADNc cacnf4-cacnr2

Se escaló en un mayor volumen las reacciones de amplificación cacnf4-cacnr2 y los amplicones se purificaron utilizando el kit GeneJET™ Gel Extraction Kit (Thermo Scientific). Las bandas de interés se cortaron del gel de agarosa con una hoja de bisturí, y después de estimar su volumen se le agregó un volumen igual del regulador de unión que contiene una alta composición de sales. La agarosa se disolvió a una temperatura de 60 °C y se transfirió a una columna de silica-gel acoplado a un microtubo para la recolección del líquido que pasa a través de esta; en seguida se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 min y se decantó el líquido obtenido. Se añadieron 750 µL de regulador de lavado con etanol, se centrifugó nuevamente decantando el líquido en el tubo de recolección. El ADN se recuperó por elución en 30 µL con regulador de elución (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, pH 8) por centrifugación por 1 min a máxima velocidad (13,000 rpm).

4.6 Ligación del fragmento amplificado de ADNc cacnf4-cacnr2 al vector pJET1.2

Los fragmentos purificados se ligaron al vector pJet 1.2/blunt (ThermoScientific-Fermentas) (Figura 9). Este vector contiene extremos romos con extremos 5' fosforilados, presenta el gen letal Eco471R para selección positiva mediante la inactivación de este gen al insertarse al fragmento amplificado evitando con ello su expresión. La reacción de ligación se hizo con una relación inserto:vector 3:1. Se emplearon 400 U de la enzima ligasa del fago T4 (400 U/ μ L, New England Biolabs) en un volumen final de 20 μ L que contenían de 100–200 ng de ADN total, y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente (22-25 °C).

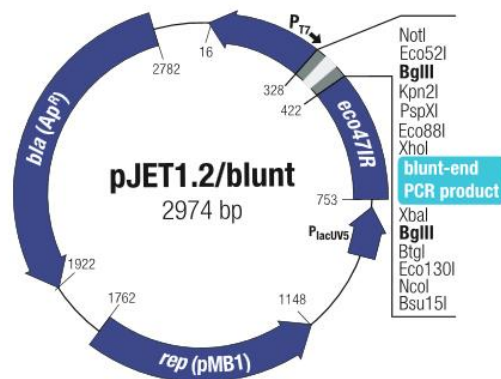


Figura 9. Esquema del vector pJET1.2/blunt. Este plásmido fue utilizado para ligar el fragmento amplificado cacnf4-cacnr2. Obtenido de Thermo Fisher Scientific manualkit PCR.

4.7 Transformación de bacterias competentes

Para realizar la transformación del vector-inserto Rx pJet 1.2/PCR cacnf4-cacnr2 se utilizaron bacterias competentes de *Escherichia coli* DH5 α . En un microtubo se realizó una mezcla con el ADN plasmídico obtenido de la ligación con el vector y las células de las bacterias competentes, éste se agitó suavemente y se colocó a 4 °C durante 30 min. Posteriormente se incubaron a 42 °C por 30 s para exponer la mezcla a un choque térmico, para garantizar la entrada eficiente del ADN a las

células bacterianas. Las células fueron crecidas en medio LB sin antibiótico y se incubaron a 37 °C por 1 h a 250 rpm. Estas células fueron sembradas en placas de agar con medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron a 37 °C por 16 h.

4.8 Purificación del ADN plasmídico

Una vez crecidas, se seleccionaron colonias aisladas de las placas y se inocularon en medio LB con ampicilina 100 (µg/mL) para posteriormente ser incubadas a 37 °C por 12-16 h a 200 rpm. Se recuperaron las células por centrifugación a 13,000 rpm por 1 min. La extracción del ADN plasmídico se llevó a cabo mediante la técnica de “miniprep” por lisis alcalina (Engbrecht, Brent et al. 2001). El paquete celular se re-suspendió en 100 µL de solución GTE (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8 y EDTA 10 mM) y se agitó vigorosamente con un vortex, posteriormente se agregaron 200 µL de solución NaOH/SDS (NaOH 0.2 N; SDS 1% p/v), se mezcló por inversión de dos a tres veces y se colocó a 4 °C por 5 min; al final de este tiempo se añadieron 150 µL de solución de acetato de potasio 5 M pH 4.8 y se incubó de nuevo a 4 °C por 5 min. Enseguida se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min y el sobrenadante se recuperó por decantación a un nuevo microtubo. A éste se añadieron 900 µL de etanol al 95% y se incubó a temperatura ambiente por 20 min con agitación suave. El ADN precipitado se precipitó por centrifugación a 13,000 rpm por 10 min, el sobrenadante se desechó y la pastilla se lavó con 500 µL de etanol al 70% y se agitó con vortex. La pastilla se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min, se desechó el sobrenadante nuevamente y las pastillas se secaron hasta que perdieran el color blanco y después se resuspendieron en 40 µL de regulador de elución con ARNasa (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 0.1 mM, ARNasa A 50 µg/mL).

4.9 Análisis de restricción para identificar las isoformas presentes en los fragmentos amplificados

Los plásmidos purificados fueron caracterizados mediante análisis de restricción con distintas enzimas. La enzima BglIII permitió identificar los plásmidos positivos que contuvieran el inserto del tamaño esperado, esto debido a que el vector pJet 1.2 contiene dos sitios BglIII en los extremos del sitio de clonación. Para identificar la isoforma α_1B se empleó la enzima HindIII, presente en la secuencia de esa isoforma (Moreno, 2016), así como en el propio plásmido. Los plásmidos no cortados con la enzima HindIII fueron cortados con las enzimas MfeI y SacI para identificar la isoforma α_1A . La isoforma α_1E se identificó cortando con las enzimas EcoRV y BspEI los plásmidos que no fueron ni positivos para α_1A ni para α_1B . Las enzimas se utilizaron de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante. Cada enzima tiene condiciones óptimas de funcionamiento en cuanto a la temperatura, pH, tiempo de digestión, concentración de sales y regulador adecuado. Brevemente, las digestiones se realizaron en un volumen final de 10 μ L con el regulador 1 \times , 3 U de la enzima y 100-200 ng del plásmido.

4.10 Secuenciación y análisis de los fragmentos seleccionados

Con base en los análisis de restricción se seleccionaron 8 muestras para secuenciar, 4 para la isoforma α_1A y para las isoformas α_1B y α_1E dos muestras para cada una. La secuenciación se solicitó en la Unidad de Secuenciación del Laboratorio de Biología Molecular de la FES Iztacala, y se llevó a cabo por el método de Sanger que se basa en la polimerización del ADN y el uso de didesoxinucleótidos (Sanger, Nicklen et al. 1992) que son marcados con fluoróforos y separados mediante electroforesis capilar. Se utilizaron los oligonucleótidos específicos en sentido pJet1.2 Forward y en antisentido pJet1.2 Reverse. Las secuencias de aminoácidos, deducidas a partir de los ADNc obtenidos, fueron comparadas con otras secuencias de canales de calcio dependientes de voltaje registradas en bases de datos en línea como GenBank utilizando el algoritmo BLASTx.

4.11 Diseño de oligonucleótidos específicos a partir del transcriptoma del ARNm de *T. sacripa elegans*.

Se solicitó el análisis transcriptómico (Wolf 2013) del ARNm del cerebro de *T. scripta elegans* en la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática del Instituto de Biotecnología de la UNAM con el fin de tener un panorama más amplio en cuanto a lo que conforma las secuencias de CCDV en esta especie.

A partir del transcriptoma se diseñaron oligonucleótidos específicos en sentido y en antisentido utilizando el software Clone Manager (SciEd) a lo largo de la secuencia del canal (Tabla 5).

Tabla 5. Oligonucleótidos específicos diseñados a partir del transcriptoma de *T. scripta elegans* utilizados para las amplificaciones del ADNc del CCDV Cav2.1.

Nombre	Sentido	Secuencia (5´-3´)	GC (%)	Tm (°C)	Longitud (pb)
TseCav2.1F1	Sentido (forward)	GGCCCAGAGGATGTACAAG	57.8	62.1	19
TseCav2.1F2	Sentido (forward)	TGTCAACCGGTCCCTGTTC	57.8	66.2	19
TseCav2.1R1	Antisentido (reverse)	TGACCATTTCGGCGGATATAG	50.0	64.6	20
TseCav2.1R2	Antisentido (reverse)	AGGAAGTCGGAGAGCCAATC	55.0	64.6	20
TseCav2.1F3	Sentido (forward)	GGAGAGCCACCATCAAGAAG	55.0	63.8	20
TseCav2.1F4	Sentido (forward)	GGAGGAAGCAGACGATCAG	57.8	62.6	19
TseCav2.1R3	Antisentido (reverse)	CTCCCTGTCATCCCTCTTG	57.8	62.3	19
TseCav2.1R4	Antisentido (reverse)	GGGCCTTGGTTCTCTTTC	55.5	61.2	18
TseCav2.1F5	Sentido (forward)	GGAGCAGAGAACGAGTGAG	57.8	60.4	19
TseCav2.1F6	Sentido (forward)	GGGAAGCCCTGTACAATGAG	55.0	63.4	20
TseCav2.1R5	Antisentido (reverse)	TTTGCTGCTGCCTGTGAAG	52.6	65.4	19
TseCav2.1R6	Antisentido (reverse)	ACCACGCAGTCAAAGACAG	52.6	61.6	19
TseCav2.1F7	Sentido (forward)	CATCCTGCTGTGGACCTTC	57.8	63.4	19
TseCav2.1F8	Sentido (forward)	GCCCTTCCCTATGTCTGTC	57.8	61.1	19
TseCav2.1R7	Antisentido (reverse)	GCCACTTACGGA ACTACTACC	52.3	59.2	21
TseCav2.1R8	Antisentido (reverse)	TGGTGCCGGATGTTGAAAG	52.6	67.1	19

TseCav2.1F9	Sentido (forward)	TTCAGACAGCGACCACTAC	52.6	59.0	19
TseCav2.1F10	Sentido (forward)	GACCTACCTCCCAAAGAAAG	50.0	59.2	20
TseCav2.1R9	Antisentido (reverse)	CCAGGTTAGCAGCAGTCATC	55.0	62.5	20
TseCav2.1R10	Antisentido (reverse)	TCAAACCGCTTCCAGGTTAG	50.0	64.0	20

4.12 Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa de los fragmentos de ADNc utilizando los oligonucleótidos específicos para el canal Cav2.1.

Se realizaron amplificaciones con pares de oligonucleótidos (forward/reverse) externos de la siguiente manera (Tabla 6):

Tabla 6. Pares de oligonucleótidos (forward-reverse) para amplificar los ADNc de los CCDV Cav2.1.

Sentido (forward)	Antisentido (reverse)
TseCav2.1F1	TseCav2.1R2
TseCav2.1F3	TseCav2.1R4
TseCav2.1F5	TseCav2.1R6
TseCav2.1F7	TseCav2.1R8
TseCav2.1F9	TseCav2.1R10

Para esto se utilizó la polimerasa de ADN de alta fidelidad (Q5 DNA polymerase, New England Biolabs, Ipswich, MA). Las condiciones de la reacción, que se realizó en un volumen final de 25 μ L, fueron: regulador para polimerasa Q5 con $MgCl_2$ 1 \times ; dNTPs 0.2 mM c/u; oligonucleótidos en sentido y antisentido 0.4 μ M c/u; polimerasa de ADN Q5 0.5 U; ADNc del cerebro de tortuga 5 μ L. Las condiciones de amplificación fueron: I) 95 $^{\circ}$ C/2 min; II) 95 $^{\circ}$ C/30 s; 55 $^{\circ}$ C/30 s; 72 $^{\circ}$ C/1.5 min; 15 ciclos; III) 95 $^{\circ}$ C/30 s; 45 $^{\circ}$ C/30 s; 72 $^{\circ}$ C/1.5 min; 20 ciclos; IV) 72 $^{\circ}$ C/5 min. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa con las muestras de las amplificaciones para observar los tamaños de estas y compararlos con los tamaños esperados.

4.13 Amplificación anidada por la reacción en cadena de la polimerasa de los fragmentos de ADNc utilizando los oligonucleótidos específicos para el canal Cav2.1.

Se realizó una amplificación anidada con el producto del primer PCR amplificado con los oligonucleótidos externos con el fin de incrementar la sensibilidad y la especificidad de la detección utilizando oligonucleótidos internos a las secuencias tentativamente amplificadas con anterioridad (Tabla 7).

Tabla 7. Pares de oligonucleótidos (forward-reverse) utilizados en la amplificación anidada para los ADNc de los CCDV Cav2.1.

Sentido (forward)	Antisentido (reverse)
TseCav2.1F2	TseCav2.1R1
TseCav2.1F4	TseCav2.1R3
TseCav2.1F6	TseCav2.1R5
TseCav2.1F8	TseCav2.1R7
TseCav2.1F10	TseCav2.1R9

De igual manera se utilizó la polimerasa de ADN de alta fidelidad (Q5 DNA polymerase, New England Biolabs, Ipswich, MA). Las condiciones de la reacción, que se realizó en un volumen final de 25 μ L, fueron: regulador para polimerasa Q5 con $MgCl_2$ 1 \times ; dNTPs 0.2 mM c/u; oligonucleótidos en sentido y antisentido 0.4 μ M c/u; polimerasa de ADN Q5 0.5 U; primer amplificado 1–2 μ L. Las condiciones de amplificación fueron: I) 95 $^{\circ}$ C/2 min; II) 95 $^{\circ}$ C/30 s; 55 $^{\circ}$ C/30 s; 72 $^{\circ}$ C/1.5 min; 15 ciclos; III) 95 $^{\circ}$ C/30 s; 45 $^{\circ}$ C/30 s; 72 $^{\circ}$ C/1.5 min; 20 ciclos; IV) 72 $^{\circ}$ C/5 min. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa con las muestras de las amplificaciones para observar los tamaños de estas y compararlos con los tamaños esperados.

4.14 Análisis de restricción para identificar los fragmentos amplificados positivos de los ADNc del canal Cav2.1 de *T. scripta elegans*.

Los fragmentos de ADN amplificados se sometieron a un análisis de restricción para comprobar su identidad. Las enzimas fueron seleccionadas de acuerdo con los sitios de restricción que presenta cada fragmento esperado en la amplificación. Se utilizaron dos enzimas diferentes en dos muestras separadas del mismo amplificado para tener una verificación más exacta. En la tabla 8 se muestran los sitios de restricción utilizados para analizar cada fragmento amplificado.

Tabla 8. Sitios de restricción utilizados para confirmar la identidad de los fragmentos amplificados del ADNc del canal Cav2.1 de *T. scripta elegans* en la PCR anidada.

Fragmento amplificado	Sitios de restricción
TseCav2.1F2-TseCav2.1R1	BamHI
	EagI
TseCav2.1F4-TseCav2.1R3	PstI
	BamHI
TseCav2.1F6-TseCav2.1R5	Sall
	BamHI
TseCav2.1F8-TseCav2.1R7	Apal
	EagI
TseCav2.1F10-TseCav2.1R9	SacII
	XmaI

4.15 Amplificaciones con oligonucleótidos específicos distantes entre sí a partir del transcrito del ARNm de *T. scripta elegans*.

Se realizaron amplificaciones con pares de oligonucleótidos específicos (forward/reverse) con una distancia mayor entre ellos para obtener un amplificado de mayor tamaño (Tabla 9).

Tabla 9. Pares de oligonucleótidos distantes (forward-reverse) utilizados en la amplificación anidada para los ADNc de los CCDV Cav2.1.

Sentido (forward)	Antisentido (reverse)
TseCav2.1F1	TseCav2.1R8
TseCav2.1F1	TseCav2.1R7
TseCav2.1F2	TseCav2.1R8
TseCav2.1F2	TseCav2.1R7

Se utilizó la polimerasa de ADN de alta fidelidad (Q5 DNA polymerase, New England Biolabs, Ipswich, MA). Las condiciones de la reacción, que se realizó en un volumen final de 25 μ L, fueron: regulador para polimerasa Q5 con $MgCl_2$ 1 \times ; dNTPs 0.2 mM c/u; oligonucleótidos en sentido y antisentido 0.4 μ M c/u; polimerasa de ADN Q5 0.5U; ADNc del cerebro de tortuga 5 μ L.

Las condiciones de amplificación fueron: I) 95 $^{\circ}$ C/2 min; II) 95 $^{\circ}$ C/30 s; 55 $^{\circ}$ C/30 s; 72 $^{\circ}$ C/1.5 min; 15 ciclos; III) 95 $^{\circ}$ C/30 s; 45 $^{\circ}$ C/30 s; 72 $^{\circ}$ C/1.5 min; 20 ciclos; IV) 72 $^{\circ}$ C/5 min. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa con las muestras de las amplificaciones para observar los tamaños de éstas y compararlos con los tamaños esperados.

4.16 Selección de fragmentos positivos en las amplificaciones para su purificación y análisis.

Los fragmentos positivos en las amplificaciones (TseCav2.1F2-TseCav2.1R1 y TseCav2.1F8-TseCav2.1R7) se purificaron (técnica descrita en el apartado 8.5), se ligaron al vector pJet1.2 (técnica descrita en el apartado 8.6) y este producto fue usado para transformar bacterias competentes (técnica descrita en el apartado 8.7). Las colonias transformantes fueron crecidas como se ha descrito para purificar a partir de ellas el ADN plasmídico (técnica descrita en el apartado 8.8). Para la verificación de su identidad se realizó un análisis de restricción con las enzimas XhoI y BglII. Se seleccionaron las clonas 13 y 14 para el primer amplificado y las clonas 71, 75 y 76 para el segundo amplificado, para las cuales se solicitó su secuenciación (técnica descrita en el apartado 8.10). Las secuencias de aminoácidos, deducidas

a partir de los ADNc obtenidos, fueron comparadas con otras secuencias de CCDV registradas en bases de datos en línea como GenBank utilizando el algoritmo BLASTx.

V. RESULTADOS

5.1 Verificación del ADNc por la RT-PCR

Las longitudes de los amplificados por la RT-PCR de los fragmentos de ADNc de los CCDV de la familia Cav2 del cerebro de tortuga, utilizando los oligonucleótidos degenerados en sentido (*cacnf4* y *cacnf1*) y antisentido (*cacnr2*) fueron las esperadas. El amplificado *cacnf4-cacnr2* fue de ~1,700 pb, mientras que el fragmento *cacnf1-cacnr2* fue de un tamaño de ~350 pb, tamaños predichos al realizar el diseño de los oligonucleótidos (Figura 10). Con el fin de obtener una mayor cantidad del amplicon *cacnf4-cacnr2*, esta reacción se escaló en un mayor volumen. En la figura 11 se muestra el gel utilizado en la purificación del fragmento *cacnf4-cacnr2*, que para este propósito fue teñido con el colorante de ADN SYBR Gold.

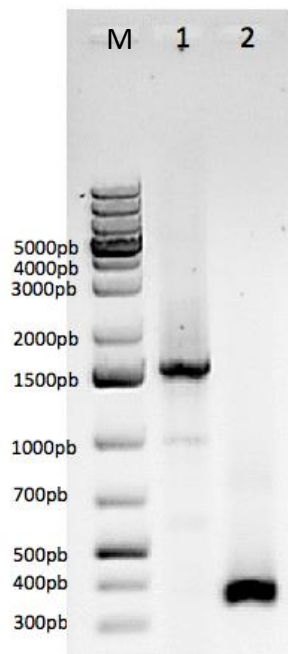


Figura 10. Reacción de amplificación de ADNc a partir del ARN total de cerebro de la tortuga con los oligonucleótidos *cacnf4*, *cacnf1* y *cacnr2*. En el carril 1 se muestra el amplificado *cacnf4-cacnr2* y en el carril 2 el amplificado *cacnf1-cacnr2*. M marcadores de peso molecular de 1 kb.

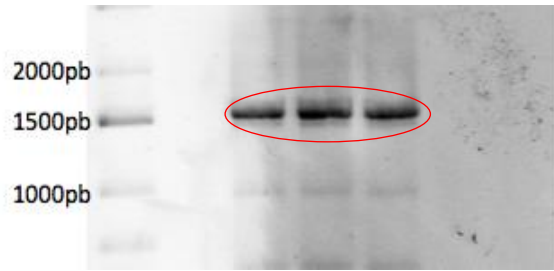


Figura 11. Electroforesis para realizar la purificación del fragmento *cacnf4-cacnr2*. En el círculo rojo se indica la banda a purificar (~1,500 pb). M marcadores de peso molecular de 1 kb.

Se comprobó la recuperación del fragmento purificado (~1,500 pb) en un gel de agarosa para posteriormente ser ligado con el vector pJET1.2.

5.2 Clonación parcial de los CCDV de la familia Cav2 de *Trachemis scripta elegans*

Debido a que los fragmentos presentaron las características esperadas, se procedió a clonarlos en el vector pJet1.2 (pJET1.2/blunt-cacnf4-cacnr2) el cual tendría un tamaño de ~4,455 pb. Para verificar las clonas positivas al vector con el inserto se realizó un análisis de restricción con la enzima BglII y las 14 muestras fueron positivas al corte. Se esperaban dos fragmentos, uno de aproximadamente ~2,928 pb y otro de ~1,527 pb. En la figura 12 se puede observar la digestión con la enzima BglII de las 14 muestras de los plásmidos obtenidos a partir de las colonias transformantes que se eligieron. En las muestras 5 y 13 se observa un patrón diferente al esperado, mientras que en la muestra 14 se observa una digestión incompleta. Este análisis indicó que aparentemente 12 de los 14 plásmidos purificados tienen el tamaño esperado del inserto.

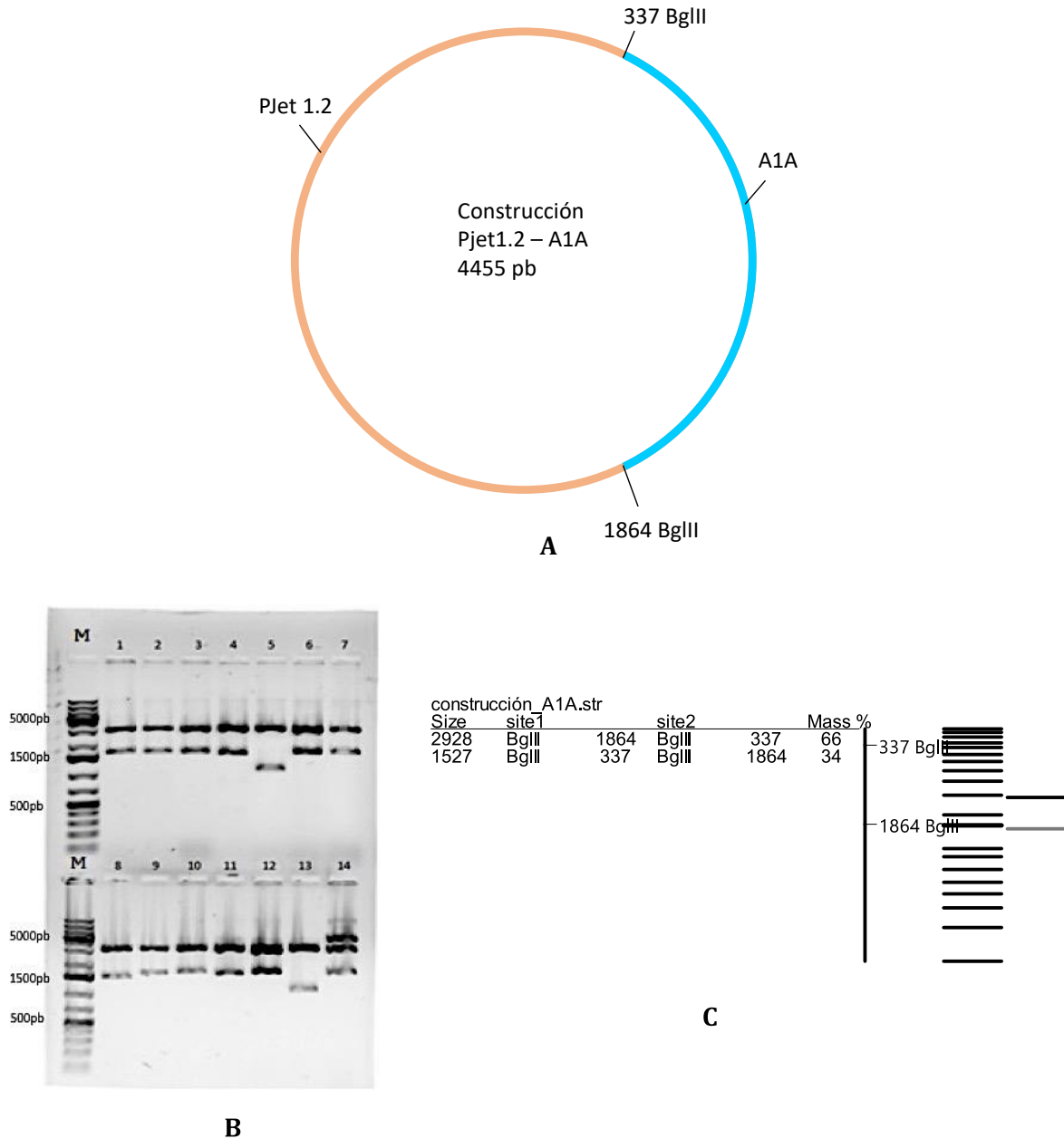
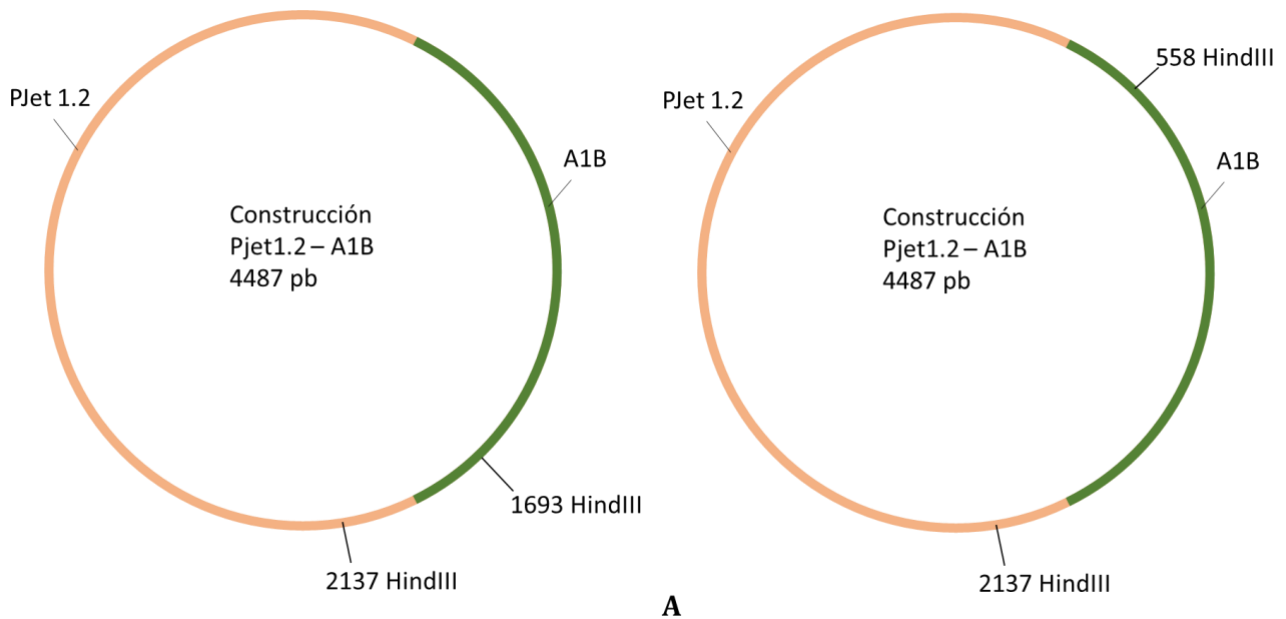


Figura 12. Análisis de restricción de los plásmidos purificados de las colonias transformantes con el fragmento cacnf4-cacnr2. A) Esquema del inserto cacnf4-cacnr2 en el vector pJET1.2-blunt; se indican los sitios de corte con la enzima BglIII (~2,928 pb y ~1,527 pb). B) Digestión de las clonas obtenidas, utilizando la enzima BglIII para identificar los insertos positivos. C) Análisis *in silico* de la digestión con la enzima BglIII.

5.3 Identificación de las clonas correspondientes a los canales α_1B

Una vez que se determinó que la mayoría de las clonas obtenidas tenían el patrón de digestión que se esperaba con BgIII, se procedió a la identificación de aquellas que correspondieran a la isoforma α_1B con el uso de la enzima HindIII, dado que el vector de clonación presenta un sitio para esta enzima y el inserto se espera que al menos tenga uno (datos no publicados). Ya que tanto el inserto como el vector tienen extremos romos, el resultado final de la ligación son dos productos que dependen de la orientación en la que el inserto se liga al vector. Un análisis *in silico* muestra que las clonas 2, 6 y 12 resultaron positivas, con fragmentos de $\sim 2,900$ pb y $\sim 1,500$ pb para uno de las opciones, y $\sim 4,000$ pb y ~ 400 pb para la otra orientación del fragmento α_1B (Figura 13).



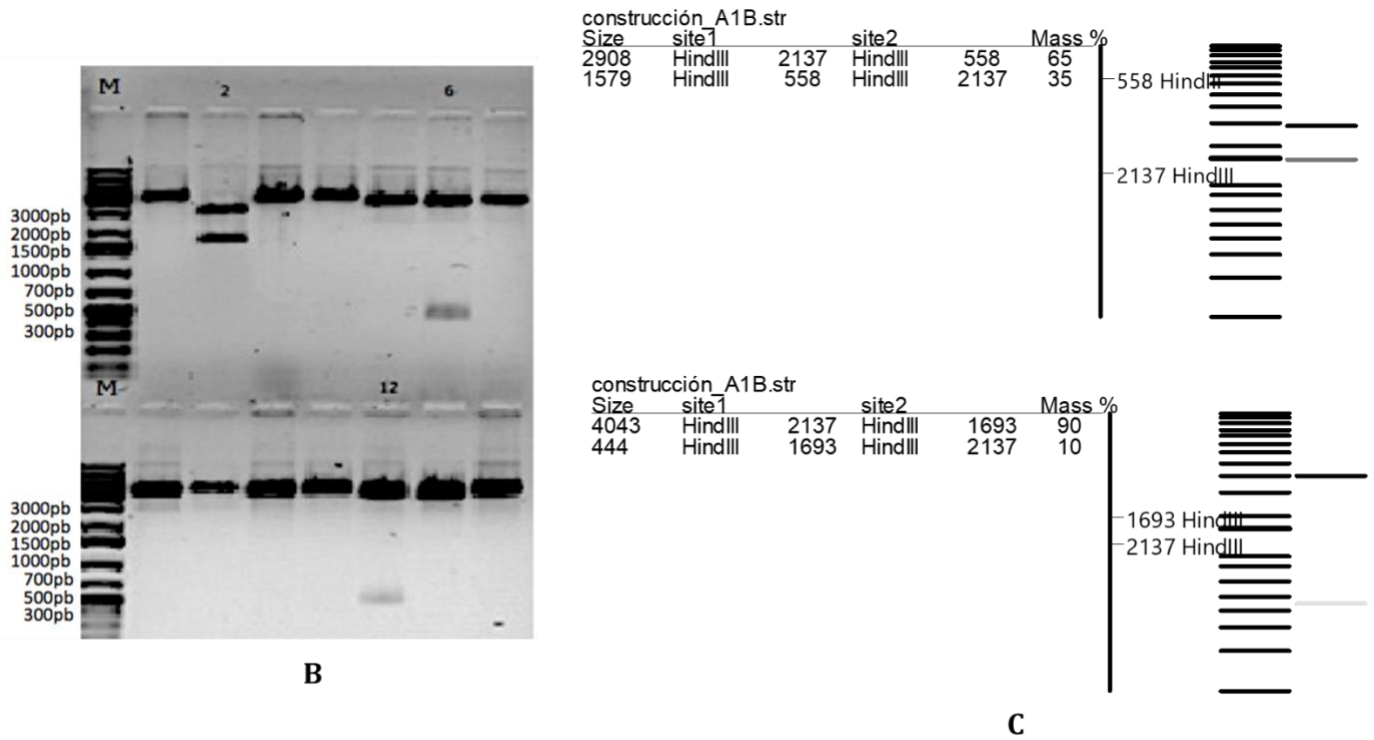


Figura 13. Análisis de restricción de los plásmidos purificados para identificar la isoforma α_1B .

A) Esquema del inserto *cacnf4-cacnr2* en el vector pJET 1.2 y los cortes con HindIII en las dos posibles orientaciones de inserción del fragmento de ADNc. B) Identificación de la isoforma α_1B por digestión de los plásmidos purificados con la enzima HindIII. Se puede observar que la muestra 2 tuvo una orientación distinta del inserto en el vector, en comparación con las muestras 6 y 12. C) Análisis *in silico* de la digestión de las clonas con la enzima HindIII.

5.4 Identificación de las clonas correspondientes a los canales α_1A

Las muestras digeridas en un solo sitio con la enzima HindIII, la cual identificó las clonas pertenecientes a la isoforma α_1B (clonas 2, 6 y 9), fueron sometidas a un análisis de restricción con las enzimas MfeI y SacI. Esta estrategia se basa en el hecho de que el vector presenta el sitio MfeI y, de forma similar que para HindIII en el caso de α_1B , se esperaba que en la isoforma α_1A existiera al menos un sitio para la enzima SacI (datos no publicados). De este análisis se identificó que las clonas positivas fueron las 3, 4, 5, 7, 8, 10 y 11. En estas clonas el patrón de digestión es variable en dependencia de la orientación del inserto en el vector, por lo cual pueden

predecirse fragmentos de ~2,800 pb y 500 pb para una orientación y ~2,500 pb y ~1,900 pb para la siguiente (Figura 14).

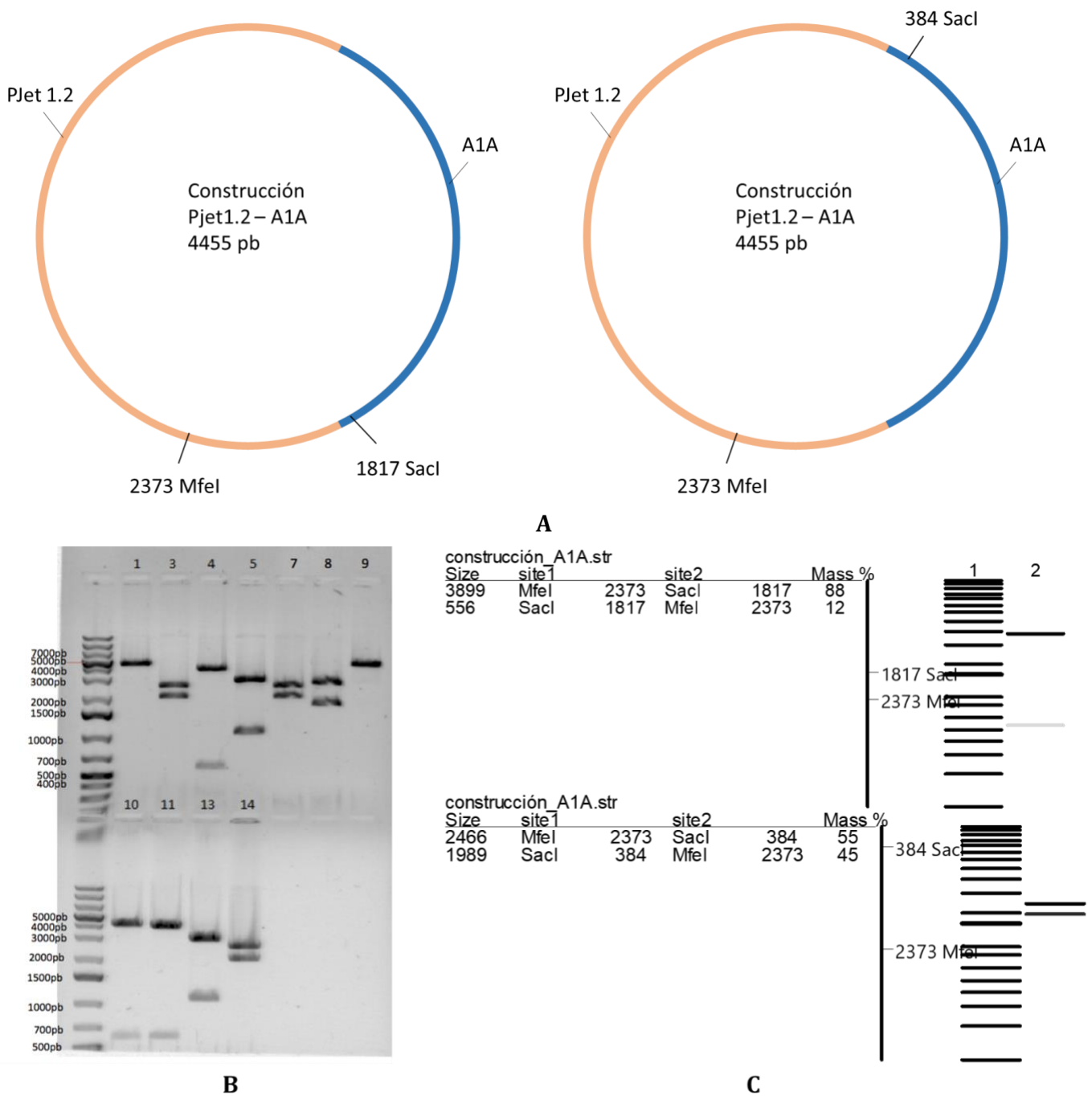
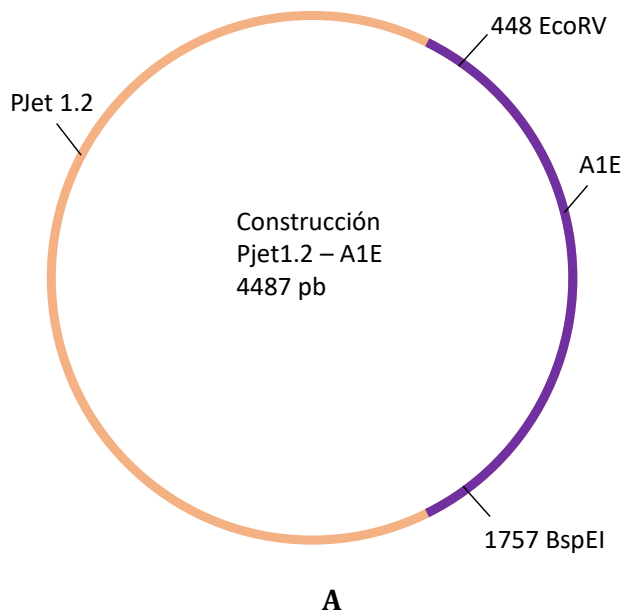


Figura 14. Análisis de restricción de los plásmidos purificados para identificar la isoforma α_1A . A) Esquemas del inserto *cacnf4-cacnr2* en el vector pJET 1.2 y cortes de las enzimas MfeI y SacI en las dos orientaciones del inserto. B) Identificación de la isoforma α_1A ; clonas positivas: 3, 4, 5, 7, 8, 10 y 11. C) Análisis *in silico* de la digestión con las enzimas MfeI y SacI y los tamaños esperados.

5.5 Identificación de las clonas correspondientes a los canales α_1E

Por exclusión se determinó que las clonas 1 y 9 corresponden a la isoforma α_1E , no obstante, con el fin de confirmarlo estos plásmidos se digirieron con las enzimas BspEI y EcoRV, que de forma similar a lo que sucede en las otras isoformas, para la primera enzima existe un sitio en el vector y se espera al menos uno en el inserto, en tanto que para la segunda se espera al menos un sitio en el inserto (datos no publicados). De igual forma que para los casos anteriores, el inserto se puede ligar en una de dos orientaciones posibles al vector, sin embargo, dado que los sitios para ambas enzimas se encuentran en el inserto, este análisis no permite identificar de manera categórica la orientación del inserto, sino solo su identidad juzgada por la digestión con las enzimas. En la Figura 15 se observa que en ambos plásmidos se obtuvieron fragmentos de $\sim 3,000$ pb y $\sim 1,300$ pb.



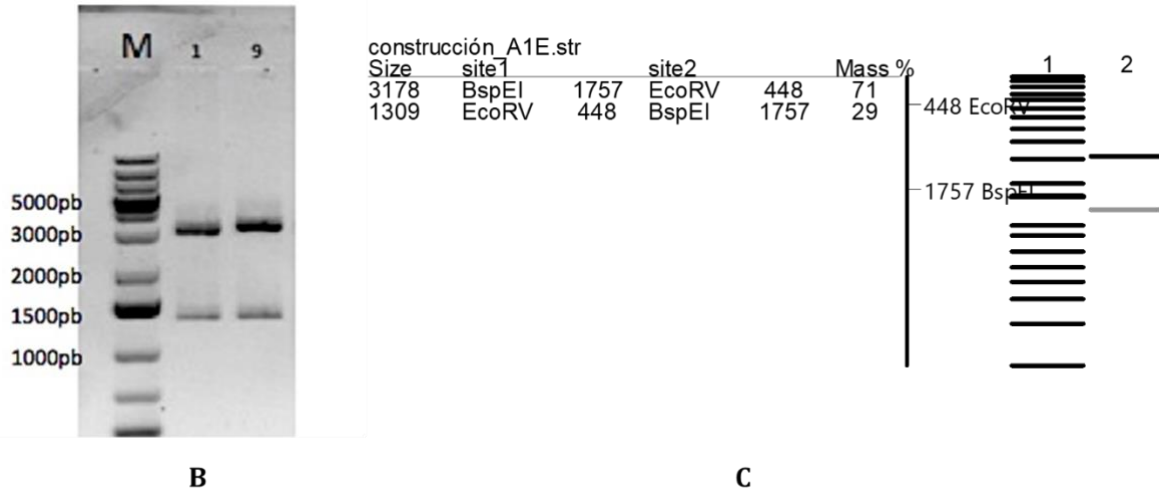


Figura 15. Digestión de las clonas 1 y 9 con las enzimas EcoRV y BspEI para la identificación de la isoforma α_1E . A) Esquema del inserto cacnf4-cacnr2 en el vector pJET 1.2 indicando la posición de los sitios para EcoRV y BspEI. B) El patrón de digestión indica que ambas clonas son positivas. C) Análisis *in silico* de la digestión de las clonas 1 y 9 con las enzimas EcoRV y BspEI y los tamaños esperados.

5.6 Análisis de las secuencias de los plásmidos obtenidos de la amplificación con los oligonucleótidos cacnf4-cacnr2

Una vez que se definió la posible identidad de cada una de las clonas analizadas, se seleccionaron algunas de ellas y se solicitó su secuenciación en la Unidad de Biología Molecular de la UBIPRO en la FES Iztacala. Se tomaron en consideración algunos criterios específicos para elegir las de mejor calidad. Estos fueron los plásmidos 1, 5, 6, 9, 11, 12, 13 y 14, y la subunidad a la que corresponden se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Plásmidos seleccionados para secuenciar

Subunidad	Nº de clona
α_{1A}	13, 14, 11, 5.
α_{1B}	6, 12.
α_{1E}	1, 9.

Las secuencias recibidas se analizaron tomando en cuenta la calidad de la señal y la longitud de las mismas. Una vez que se eliminaron las bases correspondientes al vector y que se identificaron los límites en los cuales la intensidad de la señal era

confiable, se tradujeron y se compararon con secuencias de canales de calcio dependientes de voltaje de la tortuga *C. picta* esperando una posible homología alta entre ellas. Se hicieron contiguos (forward+reverse) de las secuencias que tenían identidad con los canales y que tenían una buena calidad de secuenciación. Éstas fueron las secuencias 11 y 14 para $\alpha 1A$, 6 para $\alpha 1B$ y 1 para $\alpha 1E$. En la figura 16 se observa una muestra del electroferograma obtenido de las secuencias.



Figura 16. Muestras de los electroferogramas de la secuenciación del fragmento amplificado en sentido (A) y en antisentido (B) de la clona 11 del canal $\alpha 1A$.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas y se descartaron aquellas con baja calidad de secuenciación, fueron elegidas para α 1A las clonas 11 y 14, para α 1B la clona 6 y para α 1E la clona 1. En la tabla 11 se muestran los tamaños de las clonas obtenidas.

Tabla 11. Tamaño de las clonas resultado de la secuenciación

Subunidad	Clona	Tamaño (pb)
α 1A	11	1,445
	14	1,521
α 1B	6	1,513
α 1E	1	1,553

A las secuencias se les realizó un análisis BLAST con la base de datos de NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) lo que dio como resultado una similitud en las secuencias de nucleótidos de los genomas predichos del ARNm de los canales de calcio de tortugas. La subunidad α 1A presenta una similitud del 99% con *C. picta belli* (Figura 17), 94% con la especie *Chelonia mydas* y el 91% con *Pelodiscus sinensis*. La subunidad α 1B presenta una similitud del 99% con las tres especies antes mencionadas, lo mismo que la subunidad α 1E presenta el 97% de similitud.

La figura 17 muestra del análisis BLAST de un fragmento del amplificado de α 1A de *T. scripta elegans* alineado con la secuencia de nucleótidos de α 1A de *C. picta belli*. Al deducir la secuencia de aminoácidos de los fragmentos amplificados se realizó un análisis BLAST y se observó que la similitud no solo era con las especies de tortugas, sino con algunos otros grupos, en especial de vertebrados, lo que nos permitió elegir secuencias representativas de los cinco grupos de vertebrados para realizar una comparación entre ellas. Los alineamientos múltiples se realizaron con el programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) con las secuencias de obtenidas de la base de datos GenBank de *Xenopus tropicalis* (anfibio), *Danio rerio* (pez), *Rattus norvergicus* (mamífero), *Gallus gallus* (ave) y *C. picta* (reptil).

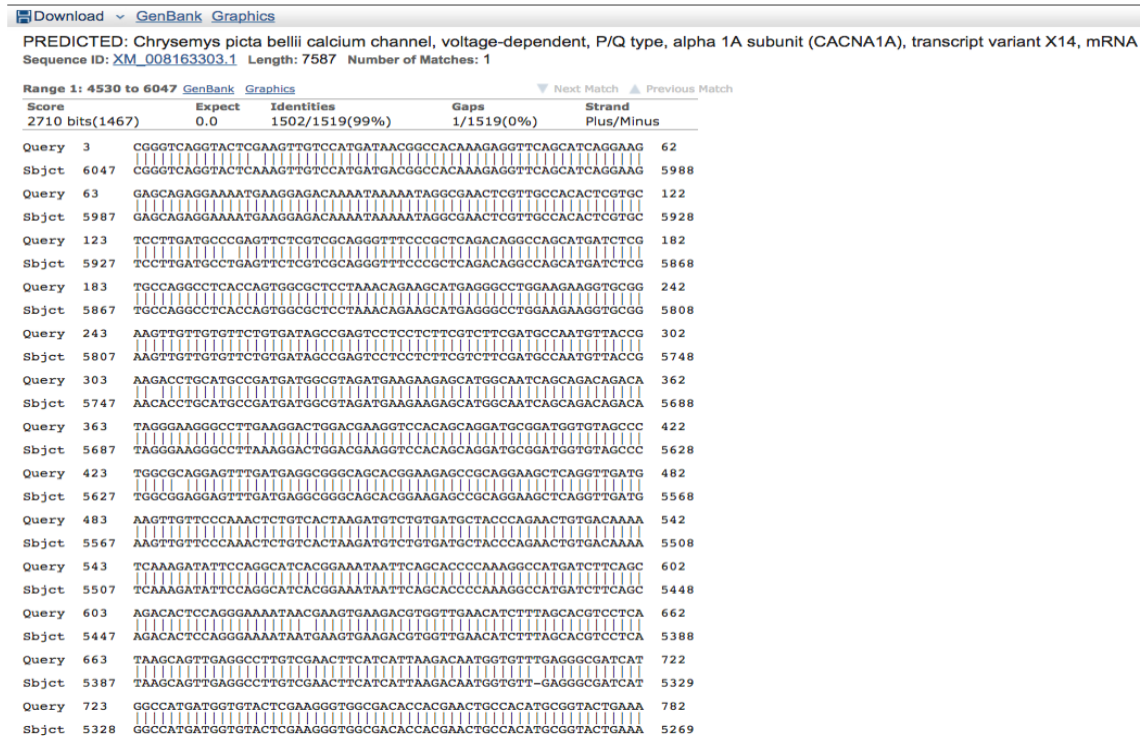


Figura 17. Muestra del análisis BLAST de un fragmento del amplificado de α_{1A} de *T. scripta elegans* alineado con la secuencia de nucleótidos de α_{1A} de *C. picta bellii*.

En los alineamientos realizados de las secuencias obtenidas de los CCDV de *T. scripta elegans* (α_{1A} , α_{1B} y α_{1E}) con secuencias de los CCDV de la familia Cav2 de los otros grupos de vertebrados, se observa que en el caso de los nucleótidos existen diferencias en las bases, sin embargo, se pueden ver grandes similitudes en la secuencia de aminoácidos. Esto no es de sorprender debido a la degeneración del código genético que permite que un aminoácido pueda ser codificado por uno o varios codones. El porcentaje de similitud entre las secuencias de los CCDV de *T. scripta elegans* evidentemente es mayor con *Chrysemys picta*, una especie de reptil, y diverge en algunas bases con los otros grupos.

Cabe recordar que la región amplificada de los CCDV subunidades α_{1A} , α_{1B} y α_{1E} con los oligonucleótidos *cacnf4-cacnr2* corresponden a la región comprendida por los segmentos transmembranales IIS1 a IVS6, y con el alineamiento de las

secuencias de los grupos de vertebrados con *T. scripta* se tiene la intención de comparar los genomas de las especies y observar si estos canales pudieran comportarse de la misma manera en los diferentes grupos de vertebrados, o por el contrario, encontrar discrepancias para predecir una posible funcionalidad diferente en la especie *T. scripta elegans*.

En el alineamiento múltiple de cada uno de los fragmentos amplificados de *T. scripta elegans* ($\alpha 1A$, $\alpha 1B$ y $\alpha 1E$) con las especies de vertebrados muestra un porcentaje alto de coincidencia en los aminoácidos de los 5 grupos con la especie modelo. La especie con la que presenta mayor número de diferencias es con el anfibio *Xenopus tropicalis*, teniendo un mayor número de coincidencias con *Chrysemys picta* (Figuras 18, 19 y 20).

```

Xenopus_A1A      TIKRLPKLKAVFDCVVNSLKNVNLILIVYMLFMFIFAVVAVQLFKGKFFYCTDESKEFQR
Danio_A1A        TIKRLPKLKAVFDCVVNSLKNVNLILIVYMLFMFIFAVVAVQLFKGRFFYCTDESKEFER
Rattus_A1A       TIKRLPKLKAVFDCVVNSLKNVNLILIVYMLFMFIFAVVAVQLFKGKFFHCTDESKEFER
Gallus_A1A       TIKRLPKLKAVFDCVVNSLKNVNLILIVYMLFMFIFAVVAVQLFKGKFFYCTDESKEFEK
Chrysemys_A1A    TIKRLPKLKAVFDCVVNSLKNVNLILIVYMLFMFIFAVVAVQLFKGKFFYCTDESKEFEK
Trachemys_A1A    TIKRLPKLKAVFDCVVNSLKNVNLILIVYMLFMFIFAVVAVQLFKGKFFYCTDESKEFEK
*****:*****:*****:*****:*****:

Xenopus_A1A      DCRGEYLVDYK-SEVKAQKREWKKWPFFHYDNVLWALLTLFTVSTGEGWPDVLRHSVDATY
Danio_A1A        DCRGEYLVERDNEVRSQKREWKKYDFHYDNVLWALLTLFTVSTGEGWPQVLKHSVDATY
Rattus_A1A       DCRGKYLLEYK-NEVKARDREWKKYDFHYDNVLWALLTLFTVSTGEGWPQVLKHSVDATF
Gallus_A1A       DCRGEYLVEYK-NEVKAQRREWKKYDFHYDNVLWALLTLFTVSTGEGWPQVLKHSVDATY
Chrysemys_A1A    DCRGEYLVEYKDNVKAQSRQWKKYEFHYDNVLWALLTLFTVSTGEGWPQVLKHSVDATY
Trachemys_A1A    DCRGEYLVEYKDNVKAQSRQWKKYEFHYDNVLWALLTLFTVSTGEGWPQVLKHSVDATY
****:*:*:*: .*:*:*: *:*:*: *****:*****:*****:

Xenopus_A1A      EDQGPRPGFRMEMSIFYVVYFVVFPPFFVNI FVALIIITFQEQGDKMEEYSLEKNERAC
Danio_A1A        ENQGSPSGYRMEMSIFYVVYFVVFPPFFVNI FVALIIITFQEQGDKMMEDYSLEKNERAC
Rattus_A1A       ENQGSPSGYRMEMSIFYVVYFVVFPPFFVNI FVALIIITFQEQGDKMEEYSLEKNERAC
Gallus_A1A       ENQGSPSGYRMEMSIFYVVYFVVFPPFFVNI FVALIIITFQEQGDKMEEYSLEKNERAC
Chrysemys_A1A    ENQGSPSGYRMEMSIFYVVYFVVFPPFFVNI FVALIIITFQEQGDKMEEYSLEKNERAC
Trachemys_A1A    ENQGSPSGYRMEMSIFYVVYFVVFPPFFVNI FVALIIITFQEQGDKMEEYSLEKNERAC
*:*:* *:*:*****:*****:*****:*****:*****:

```

Figura 18. Muestra de alineamiento de la secuencia amplificada de la subunidad $\alpha 1A$ con otros vertebrados (*Xenopus*, *Danio*, *Rattus*, *Gallus* y *Chrysemys*).

Danio_A1B	TKGKDISTIKSLRVLRLVLRPLKTIKRLPKLKAVFDCVVNSLKNVNLILIVYILFMFIFAV
Xenopus_A1B	NKGKDLNTIKSLRVLRLVLRPLKTIKRLPKLKAVFDCVVNSLKNVNLILIVYMLFMFIFAV
Rattus_A1B	SKGKDINTIKSLRVLRLVLRPLKTIKRLPKLKAVFDCVVNSLKNVNLILIVYMLFMFIFAV
Gallus_A1B	TKGKDINTIKSLRVLRLVLRPLKTIKRLPKLKAVFDCVVNSLKNVNLILIVYMLFMFIFAV
Chrysemys_A1B	SKGKDINTIKSLRVLRLVLRPLKTIKRLPKLKAVFDCVVNSLKNVNLILIVYMLFMFIFAV
Trachemys_A1B	SKGKDINTIKSLRVLRLVLRPLKTIKRLPKLKAVFDCVVNSLKNVNLILIVYMLFMFIFAV
	.****: .*****:*****
Danio_A1B	IAVQLFKGKFFYCTDESKGLEKDCRGLFLDYDKDDVTAQPREWKYEFHYDNVLWAFLLT
Xenopus_A1B	VAVQLFKGKFFYCTDESKDLEKDCRGEYLNENNDVRAQAREWKYEFHYDNVLWALLTL
Rattus_A1B	IAVQLFKGKFFYCTDESKELERDCRGQYLDYEKEEVEAQPQWKKYDFHYDNVLWALLTL
Gallus_A1B	IAVQLFKGRFFYCTDESKLEKDCRQYLDYEKNEVEAQPQWKKYEFHYDNVLWALLTL
Chrysemys_A1B	IAVQLFKGKFFYCTDESKLEKDCRQYLDYEKSEVEAQPQWKKYEFHYDNVLWALLTL
Trachemys_A1B	IAVQLFKGKFFYCTDESKLEKDCRQYLDYEKSEVEAQPQWKKYEFHYDNVLWALLTL
	:*****:***** **:* ** *:*:.* ** *:*:*****:*****:***
Danio_A1B	FTVSTGEGWPTVLKHSVDATFEDQGPSPGYRIEMSI FVVVYFVVPFFVNI FVALIIIT
Xenopus_A1B	FTVSTGEGWPNVLKHSVDATYEDQGPPTGFRMEISIFVVVYFVVPFFVNI FVALIIIT
Rattus_A1B	FTVSTGEGWPMVLKHSVDATYEEQGPSGFRMELSI FVVVYFVVPFFVNI FVALIIIT
Gallus_A1B	FTVSTGEGWPTVLKHSVDATYEEQGPSPGYRMEMSI FVVVYFVVPFFVNI FVALIIIT
Chrysemys_A1B	FTVSTGEGWPTVLKHSVDATYEEQGPSPGYRMEMSI FVVVYFVVPFFVNI FVALIIIT
Trachemys_A1B	FTVSTGEGWPTVLKHSVDATYEEQGPSPGYRMEMSI FVVVYFVVPFFVNI FVALIIIT
	***** * ***:**:* **:*:.* ** *:*:*****:*****
Danio_A1B	FQEQQDKVLSECSLEKNERACIDFAINAKPLTRYMPQNQSFQYRLWKFFVVSPPFEYSIM
Xenopus_A1B	FQEQQDKVMSECSLEKNERACIDFAISAKPLTRYMPQNRQSFQYKMWRFVVSPPFEYFIM
Rattus_A1B	FQEQQDKVMSECSLEKNERACIDFAISAKPLTRYMPQNKQSFQYKMTWTFVVSPPFEYFIM
Gallus_A1B	FQEQQDKVMSECSLEKNERACIDFAISAKPLTRYMPQNKQSFQYKMWKFVVSPPFEYFIM
Chrysemys_A1B	FQEQQDKVMSECSLEKNERACIDFAISARPLXRYMPQNKQSFQYKMWKFVVSPPFEYFIM
Trachemys_A1B	FQEQQDKVMSECSLEKNERACIDFAISARPLTRYMPQNKQSFQYKMWKFVVSPPFEYFIM
	*****:*****:.* ** * ***:**:* **:*:.* ** * ***:***** **

Figura 19. Muestra de alineamiento de la secuencia amplificada de $\alpha 1B$ con otros vertebrados (*Xenopus*, *Danio*, *Rattus*, *Gallus* y *Chrysemys*).

Danio_A1E	FIVVVGALIAFALT---NNKGRDIKTIKSLRVLRLVLRPLKTIKRLPKLKAVFDCVVTSL
Trachemys_A1E	PTLVVGALVAFALANTLGTNKGRIKTIKSLRVLRLVLRPLKTIKRLPKLKAVFDCVVTSL
Xenopus_A1E	FVVVVGALIAFALANVLGTNKGRIKTIKSLRVLRLVLRPLKTIKRLPKLKAVFDCVVNSL
Rattus_A1E	FVVVVGALVAFALANALGTNKGRIKTIKSLRVLRLVLRPLKTIKRLPKLKAVFDCVVTSL
Gallus_A1E	FIVVVGALVAFALANALGTNKGRIKTIKSLRVLRLVLRPLKTIKRLPKLKAVFDCVVTSL
Chrysemys_A1E	FIVVVGALVAFALANTLGTNKGRIKTIKSLRVLRLVLRPLKTIKRLPKLKAVFDCVVTSL
	:*****:*****: .*****:*****:*****: **
Danio_A1E	KNVFNILIVYKLFMFI FAVIAVQLFKGKFFYCTDGSMTQKCEQGYIIDYGRDRKEVKKR
Trachemys_A1E	KNVFNILIVYKLFMFI FAVIAVQLFKGKFFYCTDSSKDEKDCIGNYVDHEKNKMEVKCR
Xenopus_A1E	KNVFNILIVYKLFMFI FAVIAVQLFKGKFFYCTDSSKETEKECIGSYIDHEKNKMEVKRR
Rattus_A1E	KNVFNILIVYKLFMFI FAVIAVQLFKGKFFYCTDSSKDEKDCIGNYVDHEKNKMEVKGR
Gallus_A1E	KNVFNILIVYKLFMFI FAVIAVQLFKGKFFYCTDSSKDEKDCIGNYVDHEKNKMEVKCR
Chrysemys_A1E	KNVFNILIVYKLFMFI FAVIAVQLFKGKFFYCTDSSKDEKDCIGNYVDHEKNKMEVKCR
	*****:*****:.* **:* ** *:*:.* ** * ***:***** **
Danio_A1E	EWRRHEFHVDNLWALLTLFTVSTGEGWPQVLQHSVDVTEEDHGPSRGRNMEMSI FVVIY
Trachemys_A1E	EWKRHEFHVDNIIWALLTLFTVSTGEGWPQVLQHSVDVTEEDRGPSSRNRMEMSI FVVVY
Xenopus_A1E	EWKRHDFHYDNI IWALLTLFTVSTGEGWPQVLQHSVDITEEDRGPSSRNRMEMSI FVVIY
Rattus_A1E	EWKRHEFHVDNIIWALLTLFTVSTGEGWPQVLQHSVDVTEEDRGPSSRNRMEMSI FVVVY
Gallus_A1E	EWKRHEFHVDNIIWALLTLFTVSTGEGWPQVLQHSVDVTEEDRGPSSRNRMEMSI FVVVY
Chrysemys_A1E	EWKRHEFHVDNIIWALLTLFTVSTGEGWPQVLQHSVDVTEEDRGPSSRNRMEMSI FVVVY
	:*:***:.* ***:*****:*****:*****:*****: **
Danio_A1E	FVVFPFFVNI FVALIIITFQEQQDKMMEECLEKNERACIDFAISAKPLTRYMPQNRQT
Trachemys_A1E	FVVFPFFVNI FVALIIITFQEQQDKMMEECLEKNERACIDFAISAKPLTALHASKPTH
Xenopus_A1E	FVVFPFFVNI FVALIIITFQEQQDKMMEECLEKNERACIDFAISAKPLTRYMPQNRHT
Rattus_A1E	FVVFPFFVNI FVALIIITFQEQQDKMMEECLEKNERACIDFAISAKPLTRYMPQNRHT
Gallus_A1E	FVVFPFFVNI FVAFIIITFQEQQDKMMEECLEKNERACIDFAISAKPLTRYMPQNRHT
Chrysemys_A1E	FVVFPFFVNI FVALIIITFQEQQDKMMEECLEKNERACIDFAISAKPLTRYMPQNRHT
	*****:*****:.* ***:*****:*****:*****:*****: **

Figura 20. Muestra de alineamiento de la secuencia amplificada de $\alpha 1E$ con otros vertebrados (*Xenopus*, *Danio*, *Rattus*, *Gallus* y *Chrysemys*).

El alineamiento entre las secuencias de nucleótidos de $\alpha 1A$, $\alpha 1B$ y $\alpha 1E$ nos muestra un porcentaje de identidad entre ellas del 78%.

En el alineamiento de las secuencias de aminoácidos se observa para el canal $\alpha 1E$ una identidad del 78.06% con $\alpha 1A$ y el 79.64% con $\alpha 1B$ y para $\alpha 1A$ la identidad con $\alpha 1B$ es del 88.67%.

5.7 Clonación de los CCDV Cav2.1 utilizando oligonucleótidos específicos basados en el Transcriptoma.

Además de los oligonucleótidos degenerados descritos en este trabajo, también se diseñaron otros que permitieran la amplificación de diferentes regiones de los CCDV Cav2, sin embargo, no ha sido posible el obtener algún amplicón con su uso (datos no publicados). Por esta razón, se solicitó en la Unidad de Secuenciación Masiva del Instituto de Biotecnología de la UNAM, el transcriptoma del cerebro de la tortuga *T. scripta elegans* para poder identificar en él los transcritos de los CCDV Cav2 en esa especie, y con ello diseñar oligonucleótidos específicos que posibilitaran la amplificación completa del ADNc de cada una de las isoformas.

La primera amplificación se realizó con los oligonucleótidos específicos en sentido y antisentido (forward-reverse) a lo largo del canal Cav2.1. Los fragmentos que coincidieron con los tamaños esperados (Tabla 12) fueron los amplificados TseCav2.1F1–TseCav2.1R2 y TseCav2.1F7-TseCav2.1R8 (Figura 21).

Tabla 12. Tamaños esperados en la amplificación de los fragmentos con los oligonucleótidos específicos del canal Cav2.1.

Fragmento	Tamaño esperado (pb)
TseCav2.1F1- TseCav2.1R2	1,419
TseCav2.1F3- TseCav2.1R4	1,864
TseCav2.1F5- TseCav2.1R6	1,803
TseCav2.1F7- TseCav2.1R8	1,784
TseCav2.1F9-TseCav2.1R10	1,196

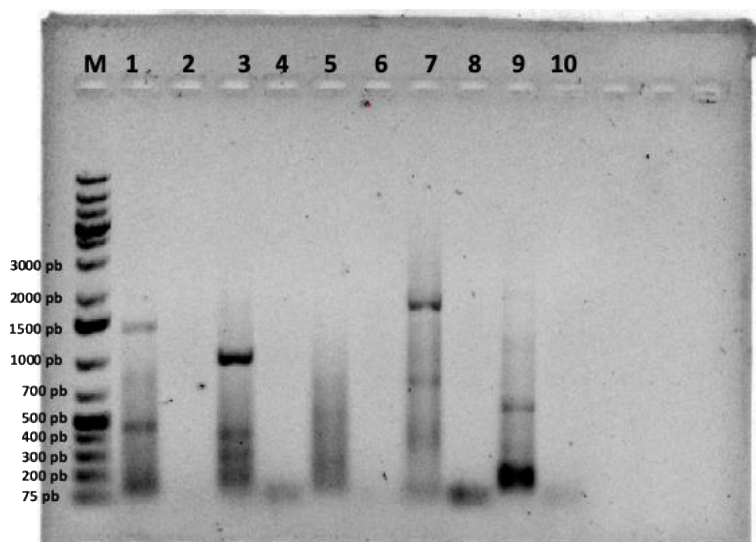


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación con oligonucleótidos específicos (forward-reverse) a lo largo del canal $Ca_v2.1$. M) Marcador de peso molecular 1Kb. 1) Fragmento TseCav2.1F1-TseCav2.1R2. 2) Control negativo de 1. 3) Fragmento TseCav2.1F3-TseCav2.1R4. 4) Control negativo de 3. 5) Fragmento TseCav2.1F5-TseCav2.1R6. 6). Control negativo de 5. 7) Fragmento TseCav2.1F7-TseCav2.1R8. 8) Control negativo de 7. 9) Fragmento TseCav2.1F9-TseCav2.1R10. 10) Control negativo de 9.

Con el propósito de aumentar la sensibilidad y especificidad de las reacciones de amplificación, se decidió realizar una amplificación anidada con oligonucleótidos internos para cada una de las primeras reacciones, independientemente de que haya sido posible o no observar algún fragmento amplificado en el gel, o que los tamaños del amplificado no coincidan con los tamaños esperados (Tabla 13). En la figura 22 se muestra el resultado de la amplificación; se puede observar que solo el amplificado TseCav2.1F2-TseCav2.1R1 y el TseCav2.1F8-TseCav2.1R7 coincidieron con el tamaño esperado (Tabla 13).

Tabla 13. Tamaños esperados en la amplificación anidada de los fragmentos con los oligonucleótidos específicos internos del canal Cav2.1.

Fragmento	Tamaño esperado (pb)
TseCav2.1F2- TseCav2.1R1	1,419
TseCav2.1F4- TseCav2.1R3	1,864
TseCav2.1F6- TseCav2.1R5	1,803
TseCav2.1F8- TseCav2.1R7	1,784
TseCav2.1F10-TseCav2.1R9	1,196

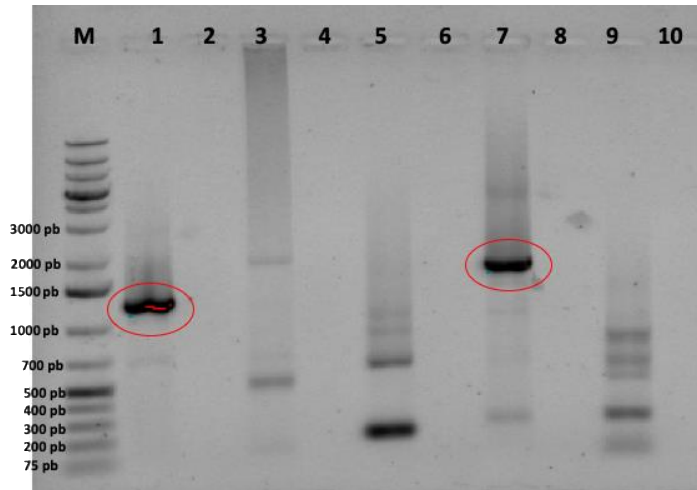


Figura 22. Electroforesis de amplificación anidada con oligonucleótidos internos específicos, usando como molde el primer amplificado con oligonucleótidos específicos del canal $Ca_v2.1$. M) Marcador de peso molecular 1Kb. 1) Fragmento TseCav2.1F2-TseCav2.1R1. 2) Control negativo de 1. 3) Fragmento TseCav2.1F4-TseCav2.1R3. 4) Control negativo de 3. 5) Fragmento TseCav2.1F6-TseCav2.1R5. 6). Control negativo de 5. 7) Fragmento TseCav2.1F8-TseCav2.1R7. 8) Control negativo de 7. 9) Fragmento TseCav2.1F10-TseCav2.1R9. 10) Control negativo de 9.

5.8 Análisis de restricción para verificar la identidad de las amplificaciones anidadas con los oligonucleótidos específicos diseñados a partir del transcriptoma del canal Cav2.1 de *T. scripta elegans*.

Se realizó un análisis de restricción para identificar la identidad de los fragmentos amplificados. Esto, con los sitios de restricción localizados para cada fragmento, utilizando dos enzimas por separado para cada fragmento (Tabla 8). En la electroforesis se observan fragmentos que coinciden con el tamaño esperado en el amplificado TseCav2.1F2-TseCav2.1R1 y en TseCav2.1F8-TseCav2.1R7, confirmando lo anterior en cuanto a que estos fragmentos contienen las secuencias esperadas (Figura 23 y Tabla 14).

Tabla 14. Tamaños esperados en el análisis de restricción de la amplificación anidada de los fragmentos con los oligonucleótidos específicos internos del canal Cav2.1.

Fragmento amplificado	Sitio de restricción	Tamaño esperado (pb)
TseCav2.1F2-TseCav2.1R1	BamHI	822, 404
	EagI	844, 382
TseCav2.1F4-TseCav2.1R3	PstI	950, 386

	BamHI	1469, 317
TseCav2.1F6-TseCav2.1R5	Sall	1116, 418, 117
	BamHI	1244, 405
TseCav2.1F8-TseCav2.1R7	Apal	1335, 387
	EagI	1170, 544
TseCav2.1F10-TseCav2.1R9	SacII	492, 344
	XmaI	685, 151

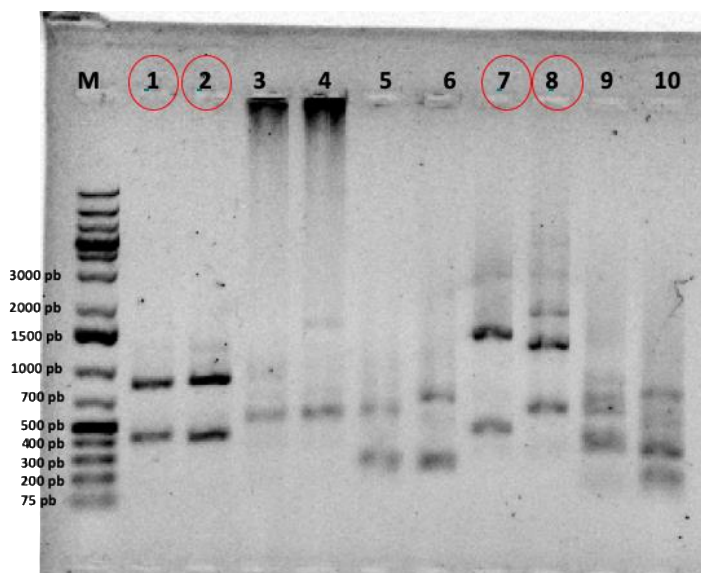


Figura 23. Electroforesis del análisis de restricción de los fragmentos de la amplificación anidada con los oligonucleótidos específicos. M) Marcador de peso molecular 1 Kb. 1) Fragmento TseCav2.1F2-TseCav2.1R1 digerido con BamHI. 2) Fragmento TseCav2.1F2-TseCav2.1R1 digerido con EagI. 3) Fragmento TseCav2.1F4-TseCav2.1R3 digerido con PstI. 4) Fragmento TseCav2.1F4-TseCav2.1R3 digerido con BamHI. 5) Fragmento TseCav2.1F6-TseCav2.1R5 digerido con Sall. 6) Fragmento TseCav2.1F6-TseCav2.1R5 digerido con BamHI. 7) Fragmento TseCav2.1F8-TseCav2.1R7 digerido con Apal. 8) Fragmento TseCav2.1F8-TseCav2.1R7 digerido con EagI. 9) Fragmento TseCav2.1F10-TseCav2.1R9 digerido con SacII. 10) Fragmento TseCav2.1F10-TseCav2.1R9 digerido con XmaI.

5.9 Amplificaciones con oligonucleótidos específicos distantes entre sí a partir del transcriptoma del ARNm de *T. scripta elegans*.

Se probó el amplificar regiones de mayor longitud utilizando oligonucleótidos específicos en sentido (forward) y en antisentido (reverse) con posiciones a mayor distancia entre sí. El primer amplificado se realizó con los oligonucleótidos

TseCav2.1F1-TseCav2.1R8, con los cuales no se observó amplificación alguna al realizar la electroforesis en gel de agarosa (Figura 24).

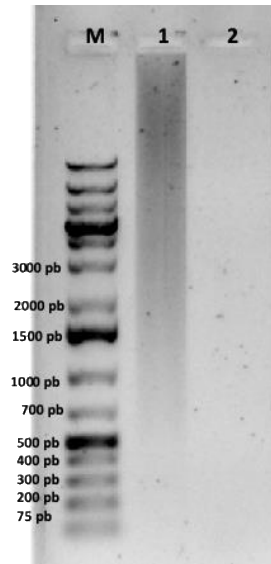


Figura 24. Electroforesis de amplificación con oligonucleótidos TseCav2.1F1-TseCav2.1R8. M) Marcador de peso molecular 1Kb. 1) Fragmento TseCav2.1F1-TseCav2.1R8. 2) Control negativo de 1.

Se realizaron amplificaciones con otros tres pares de oligonucleótidos específicos distantes entre sí, y el resultado no fue el esperado, ya que en la electroforesis de los amplificadores no se observa alguna banda que evidencie la presencia de algún fragmento amplificado (Figura 25).

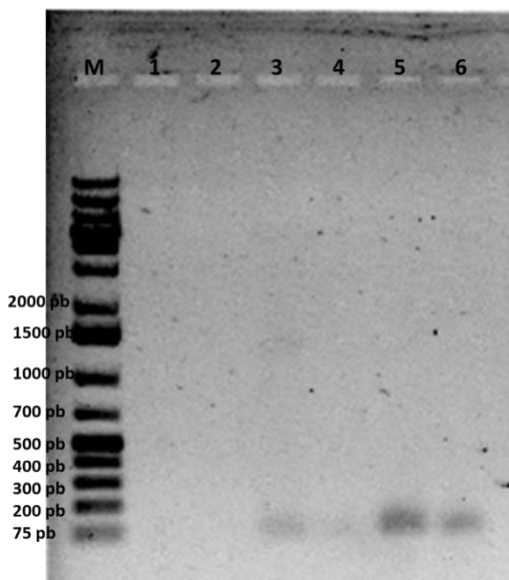
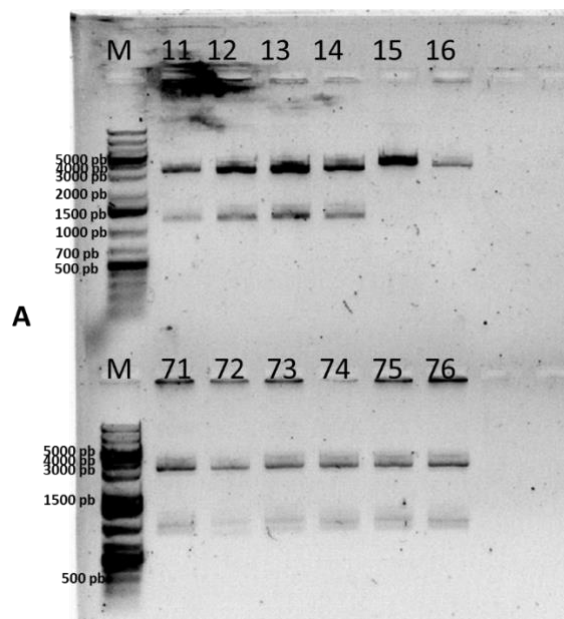


Figura 25. Electroforesis de las amplificaciones con oligonucleótidos específicos con mayor distancia entre sí. M) Marcador de peso molecular 1Kb. 1) Fragmento TseCav2.1F1-TseCav2.1R7. 2) Control negativo de 1. 3) Fragmento TseCav2.1F2-TseCav2.1R8. 4) Control negativo de 3. 5) Fragmento TseCav2.1F2-TseCav2.1R7. 6) Control negativo de 5.

5.10 Fragmentos TseCav2.1F2-TseCav2.1R1 y TseCav2.1F8-TseCav2.1R7 regiones seleccionadas para ser secuenciadas.

Se decidió trabajar con los fragmentos que resultaron positivos en las amplificaciones anidadas, es decir, los fragmentos TseCav2.1F2-TseCav2.1R1 y TseCav2.1F8-TseCav2.1R7. Se realizaron amplificaciones para escalarlas en un mayor volumen y se procedió a ser transformados sin ser purificados previamente ya que al purificar los fragmentos (técnica descrita en el apartado 8.5) y realizar la electroforesis para comprobar el tamaño de los fragmentos purificados, éstos no se mostraban en el gel de agarosa. Después de ser transformados en bacterias competentes (técnica descrita en el apartado 8.6), se ligaron al vector pJet1.2 (técnica descrita en el apartado 8.7).

Se obtuvieron 6 clonas para cada fragmento y se sometieron a un análisis de restricción para comprobar su identidad con la región del canal Cav2.1. Las clonas del fragmento TseCav2.1F2-TseCav2.1R1 se cortaron con la enzima XhoI y las clonas correspondientes al fragmento TseCav2.1F8-TseCav2.1R7 fueron cortadas con la enzima BglII. Todas las clonas coincidieron con el tamaño esperado en el análisis de restricción (Figura 26). Se eligieron las clonas 13 y 14 del fragmento TseCav2.1F2-TseCav2.1R1 y del fragmento TseCav2.1F8-TseCav2.1R7 se seleccionaron las clonas 71, 75 y 76 para ser enviadas a secuenciar.



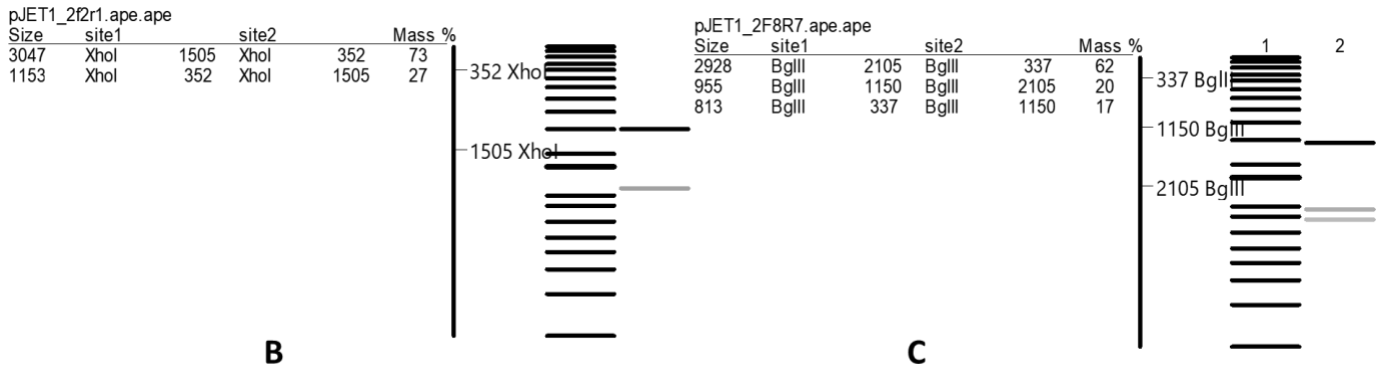


Figura 26. Análisis de restricción de los fragmentos TseCav2.1F2-TseCav2.1R1 y TseCav2.1F8-TseCav2.1R7. A) Electroforesis en gel de agarosa del análisis de restricción: 11-16 clonas correspondientes al fragmento TseCav2.1F2-TseCav2.1R1 digeridas con la enzima XhoI. 71-76 clonas correspondientes al fragmento TseCav2.1F8-TseCav2.1R7 digeridas con la enzima BglII. B) Análisis *in silico* de la digestión de las clonas del fragmento TseCav2.1F2-TseCav2.1R1, tamaños esperados: 3047 pb y 1,153 pb. C) Análisis *in silico* de la digestión de las clonas del fragmento TseCav2.1F8-TseCav2.1R7, tamaños esperados: 2,928 pb, 955 pb y 813 pb.

Las secuencias recibidas se analizaron mediante la comparación en la base de datos NCBI BLAST. Los fragmentos amplificados TseCav2.1F2-TseCav2.1R1 y TseCav2.1F8-TseCav2.1R7 muestran una identidad del 98% con la secuencia del canal Cav2.1 de *C. picta belli* predicho a partir del genoma de dicha especie (Figura 27).

PREDICTED: Chrysemys picta bellii calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit (CACNA1A), transcript variant X14, mRNA
 Sequence ID: [XM_008163303.1](#) Length: 7587 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1652 bits(894)	0.0	934/951(98%)	12/951(1%)	Plus/Plus
Query 30	GATTTGTC AACCGTCCCTGTTCTCTTCAGCGAGGATAATGGTGAGGAAATACGCCAA	89		
Sbjct 807	GACTGTCAACCGTCCCTGTTCTCTTCAGCGAGGATAATGGTGAGGAAATACGCCAA	866		
Query 90	AAAGATCACCGAATGGCTCCTTTTGAATACATGATTTAGCTACTATCATAGCGAAGCTG	149		
Sbjct 867	AAAGATCACCGAATGGCTCCTTTTGAATACATGATTTAGCTACTATCATAGCGAAGCTG	926		
Query 150	CATTGTTCTTGCTCTGGAGCAGCACCTGCCTGATGAAGACAAGACCCCGATGTCAGAAGC	209		
Sbjct 927	CATTGTTCTTGCTCTGGAGCAGCACCTGCCTGATGAAGACAAGACCCCGATGTCAGAAGC	986		
Query 210	ACTGGATGACACCGAACCATAATTCATCGGAATCTTTGTTTTGAGGCTGGAATTAAT	269		
Sbjct 987	ACTGGATGACACCGAACCATAATTCATCGGAATCTTTGTTTTGAGGCTGGAATTAAT	1046		
Query 270	CATCGCCTTAGGGTTTGCTTTCCACAAAGGCTCCTATCTGAGGAATGGGTGGAATGTGAT	329		
Sbjct 1047	CATCGCCTTAGGGTTTGCTTTCCACAAAGGCTCCTATCTGAGGAATGGGTGGAATGTGAT	1106		
Query 330	GGACTTCGTGGTGGTCTTACAGGCATCTGGCGAAAGTCGGCTCCGACTTCGACCTGCG	389		
Sbjct 1107	GGACTTCGTGGTGGTCTTACAGGCATCTGGCGAAAGTCGGCTCCGACTTCGACCTGCG	1166		
Query 390	AACACTGCGGGCAGTTCTGTGTCTCCGGCCGCTAAAGCTGGGTCTCGGGATCCCAAGTTT	449		
Sbjct 1167	AACACTGCGGGCAGTTCTGTGTCTCCGGCCGCTAAAGCTGGGTCTCGGGATCCCAAGTTT	1226		
Query 450	ACAAGTTGTTCTGAAGTCCATCATGAAGCTATGATACCTGTCTACAAATGGCCTACT	509		
Sbjct 1227	ACAAGTTGTTCTGAAGTCCATCATGAAGCTATGATACCTGTCTACAAATGGCCTACT	1286		
Query 510	CTTGTTTTTGCAATCCTTATTTTTCGAATCATAGGATTAGAAATTTTATATGGGAAAATT	569		
Sbjct 1287	CTTGTTTTTGCAATCCTTATTTTTCGAATCATAGGATTAGAAATTTTATATGGGAAAATT	1346		
Query 570	TCACACCACCTGCTTTGACTCGGTGACAGGCGAAATCAAGTTCGATGTTCCATGTGGGAC	629		
Sbjct 1347	TCACACCACCTGCTTTGACTCGGTGACAGGCGAAATCAAGTTCGATGTTCCATGTGGGAC	1406		

Figura 27. Muestra del análisis BLAST del fragmento TseCav2.1F2-TseCav2.1R1 amplificado comparado con el genoma predicho de *C. picta belli*.

VI. DISCUSIÓN

Los canales de calcio de la familia Cav2 tienen un papel importante en la liberación de los neurotransmisores en las sinapsis rápidas de las neuronas en los vertebrados. Se conocen las secuencias de estas proteínas principalmente en el grupo de los mamíferos, sin embargo, la información es escasa en cuanto al grupo de los reptiles, o nula en algunas especies como lo es el caso de la tortuga *T. scripta elegans*.

Los datos de este trabajo indican que la subunidad α_1A se encuentra en mayor proporción en el cerebro de la tortuga, seguida de α_1B y α_1E , esto con base en el número de clonas obtenidas de cada tipo de canal. No obstante, habrá que profundizar en el análisis para verificar este hecho ya que la cantidad de muestras analizadas fue pequeña, e incluso en diferentes regiones del cerebro las proporciones pudieran diferir.

Diversos estudios han revelado la distribución neuronal de estas subunidades: las subunidades α_1A y α_1B están expresadas principalmente en dendritas y terminales presinápticas. En general, α_1A está concentrada en un mayor número de terminales neurales en comparación con α_1B (Day, Shaw et al. 1996). Esto podría explicar la mayor proporción de la isoforma α_1A detectada.

La importancia del canal α_1A se destacó por la evidencia de las mutaciones en el gen CACNA1A, ya que se sabe puede causar un grupo de trastornos neurológicos humanos con herencia dominante como la migraña hemipléjica familiar, la ataxia episódica tipo 2 y la ataxia espinocerebelar tipo 6 (Ophoff, Terwindt et al. 1996, Zhuchenko, Bailey et al. 1997). La característica del canal tipo P/Q está determinada principalmente por la subunidad α_1 , que contiene el poro de conducción y el sensor de voltaje. Esta subunidad es una proteína de aproximadamente 2,000 aminoácidos organizados en cuatro dominios homólogos que contienen cada uno seis segmentos transmembranales (S1-S6). El fragmento amplificado en este trabajo

corresponde a la región formadora del poro donde la ω -Agatoxina IVA y las ω -Conotoxinas se unen a la boca externa de la subunidad formadora de poros en los canales α_1A y α_1B , respectivamente (Adams, Myers et al. 1993, Doering y Zamponi 2003).

Se sabe que los canales Cav2.1 median la entrada de Ca^{2+} en las neuronas y la liberación de neurotransmisores en las sinapsis del sistema nervioso central. Los determinantes estructurales de la inactivación de los canales Cav2.1 se encuentran en diferentes partes de las subunidades α_1 del canal, incluidos los segmentos y bucles transmembrana formadores de poros, los conectores de dominio intracelular y el carboxilo terminal (Herlitze, Hockerman et al. 1997, Soldatov, Zuhlke et al. 1997). La inactivación rápida y lenta dependiente del voltaje de este tipo de canal está regulada por subunidades β auxiliares y otras proteínas reguladoras intracelulares (Sather, Tanabe et al. 1993).

En ratones con delección del gen que codifica para Cav2.1, muestran ataxia severa y desarrollan convulsiones por su ausencia, mueren aproximadamente en 4 semanas después de nacer (Jun, Piedras-Renteria et al. 1999). El fenotipo atáxico observado con estos animales es consistente con la importancia de los canales tipo P/Q en la fisiología cerebral. En placas terminales de neuronas del hipocampo y en moto neuronas, hay una compensación funcional por los canales Cav2.2 y Cav2.3 que permite continuar con la transmisión sináptica (Jun, Piedras-Renteria et al. 1999, Urbano, Piedras-Renteria et al. 2003), a pesar de que las convulsiones indican que esta compensación es incompleta. En varias líneas de ratones con mutaciones en los canales Cav2.1 se han identificado los síntomas de ataxia y convulsiones en distintas maneras, por ejemplo, en los ratones en los que se eliminan los canales Cav2.1 en las células de Purkinje no presentan el espectro completo de disfunciones neurológicas, sino que se desarrollan durante la edad adulta (Mark, Maejima et al. 2011). Esto sugiere un importante rol de estos canales en el desarrollo temprano (Simms y Zamponi 2014).

En humanos, las alteraciones en los canales Cav2.1 producen una variedad de fenotipos. Las mutaciones de ganancia de función en el gen CACNA1A se han relacionado con la migraña hemipléjica familiar, y un amplio rango de enfermedades

(Tottene, Conti et al. 2009, Pietrobon y Moskowitz 2013). Se han identificado algunas mutaciones de pérdida de función que conducen a variaciones aberrantes de splicing, éstas identificadas en pacientes con ataxia tipo 2 (Pietrobon 2010, Kipfer, Jung et al. 2013).

Berjukow, Marksteiner et al. en 2001 identifican puntos importantes en el segmento IVS6 de la subunidad α_1 que determinan la inactivación del canal, los cuales ocurren de manera independiente a la a la subunidad $\beta_2\alpha$, esta región corresponde a los residuos: AYFYFVSFIFLCSFLMLNLFVAVIM, y se encuentra conservada en el caso de *T. scripta elegans*, por lo que se infiere que esta actividad ocurre de la misma forma en la tortuga. Sin embargo, los detalles estructurales de cómo el segmento IVS6 influye en la inactivación del canal aún no se han aclarado.

(Hans, Urrutia et al. 1999) reporta que los aminoácidos en las regiones IVS3-S4 del canal Cav2.1 son importantes en el mecanismo general para controlar la inactivación y sus cambios en la secuencia podrían alterar significativamente la transmisión sináptica y por lo tanto, tener profundas consecuencias fisiológicas. En este trabajo se amplificaron esas regiones, las cuales coinciden con la secuencia de aminoácidos reportada en mamíferos, sugiriendo que su funcionamiento es similar.

Los canales tipo Cav2.2 se localizan en las terminales nerviosas presinápticas y median eventos clave como la sinaptogénesis y la neurotransmisión. Se ha determinado que estos canales son sustrato de la cinasa 5 dependiente de ciclina (Cdk5). La subunidad α_1 formadora del poro del canal se fosforila en el dominio C-terminal, y esta fosforilación da como resultado un aumento de la afluencia de calcio debido al aumento de la probabilidad de apertura del canal. La fosforilación del canal tipo N o Cav2.2 por Cdk5 facilita la liberación de los neurotransmisores y altera la plasticidad presináptica aumentando el número de vesículas en la presinápsis. Estos efectos están mediados por una interacción alterada entre los canales de calcio de tipo N y la proteína RIM1, que ancla los canales de calcio presinápticos a la zona activa (Su, Seo et al. 2012). En la secuencia amplificada de este canal de la tortuga, se aprecia que esta región está altamente conservada, lo

que también sugiere que el funcionamiento de este mecanismo es similar en este grupo de vertebrados.

Los estudios en ratones que carecen del canal Cav2.2 muestran un fenotipo mucho más amigable en comparación con los ratones con ausencia de Cav2.1. Presentan hiposensibilidad al dolor inflamatorio y neuropático, lo que encaja con la importancia de estos canales en la transmisión sináptica entre las fibras sensoriales y las neuronas del asta dorsal en la médula espinal (Hatakeyama, Wakamori et al. 2001, Kim, Jun et al. 2001, Saegusa, Kurihara et al. 2001, Simms y Zamponi 2014). Estos ratones también muestran déficits en el control simpático de la frecuencia cardíaca y la presión arterial y son hiperactivos (Mori, Nishida et al. 2002, Beuckmann, Sinton et al. 2003).

Las neuronas de *T. scripta elegans* en estado de anoxia muestran un aumento de aproximadamente 2 veces en la concentración de Ca₂₊ intracelular (240 nM) durante las primeras 2–3 h, pero luego el Ca₂₊ se estabiliza a este nivel durante semanas de exposición a la anoxia (Bickler 1998). Por lo tanto, la regulación de los niveles de calcio intracelular puede ser una parte crucial de la tolerancia a la anoxia y puede requerir ajustes de las actividades o niveles de las proteínas de almacenamiento de Ca₂₊, y de otras proteínas que responden al Ca₂₊ para ayudar a mantener el nivel de Ca₂₊ intracelular en los límites adecuados. La CaMKII, como se mencionó anteriormente es una cinasa de proteínas dependiente de Ca₂₊ y se ha demostrado que la actividad de esta enzima a lo largo de la anoxia no cambia, pero sí durante las actividades de recuperación aeróbica, donde disminuyó significativamente su actividad en un 37–40%, cambios que se deben a la modificación postraduccional, posiblemente como resultado de la acción de la fosforilación (Storey 2007), ya que ésta reduce la actividad de la CaMKII.

La corriente tipo R no necesariamente refleja un tipo de canal único, sino una familia de canales molecularmente distintos con características farmacológicas y electrofisiológicas similares (Snutch 2013). Se sabe que estos canales están disponibles en el potencial de reposo, son activados por el potencial de acción y

permanecen abiertos para inducir una posdespolarización, debido a que ésta se relaciona directamente con el disparo en ráfagas de las neuronas CA1 del hipocampo, los canales Cav2.3 son cruciales para este importante comportamiento celular, que codifica los campos hipocampales del lugar y aumenta la plasticidad (Metz, Jarsky et al. 2005).

Los canales Cav2.3 no pueden ser clasificados perfectamente en las categorías HVA o LVA. En reportes donde se han aislado ADNc de α_{1E} a partir de cerebro de conejo, rata y raya eléctrica, estos clones codifican proteínas de 2,178–2,259 aminoácidos con masas molares predichas de aproximadamente 250 kDa (Niidome, Kim et al. 1992, Horne, Ellinor et al. 1993, Soong, Stea et al. 1993). Los canales Cav2.1 y Cav2.2 tienen alrededor de un 85-90 % de identidad con los Cav2.3, lo que sugiere que los canales α_{1E} son miembros de un subgrupo de canal insensible a las DHPs (Niidome, Kim et al. 1992). Estos canales se han encontrado en niveles altos de expresión en el Sistema Nervioso Central de mamíferos en la corteza cerebral, hipocampo y músculo liso, y niveles más bajos en las células del cerebelo, bulbo olfatorio, mesencéfalo y células de Purkinje. No se detectan en músculo esquelético, corazón, estómago o riñón. A nivel subcelular se identifican casi exclusivamente en el cuerpo celular de las neuronas (Yokoyama, Westenbroek et al. 1995). Estudios en ratones con delección del canal Cav2.3 presentan un fenotipo poco agresivo que incluye hiposensibilidad al dolor y resistencia a las convulsiones inducidas químicamente (Saegusa, Matsuda et al. 2002, Weiergraber, Henry et al. 2007). Actualmente no se conocen mutaciones de este canal en humanos y esto probablemente es porque las mutaciones en estos canales generan solo fenotipos no agresivos, médicamente no detectados (Simms y Zamponi 2014).

El fragmento amplificado en este trabajo muestra similitud en la secuencia de aminoácidos al realizar la comparación con otras especies de vertebrados, con lo cual podemos deducir que el funcionamiento del canal α_{1E} es similar en la especie *T. scripta elegans* y los demás grupos de vertebrados, especialmente por la información obtenida de estudios antes mencionados en mamíferos.

El Ca^{2+} modula casi todos los aspectos de la función celular en las bacterias, protistas, plantas, hongos y animales. La evolución de las moléculas primitivas que forman los principios básicos de la señalización de Ca^{2+} se produjo muy temprano en los procesos de la vida de los organismos procariontes; en las eucariotas, los organelos intracelulares como las mitocondrias, los lisosomas y el retículo endoplásmico emergieron como compartimientos intracelulares de Ca^{2+} para permitir probablemente una mejor regulación espacial y temporal de las concentraciones de Ca^{2+} en respuesta a estímulos ambientales más complejos (Cai, Wang et al. 2014).

La señalización del calcio evolucionó alrededor de variaciones en la concentración de calcio dentro del citosol en la célula, proviniendo del espacio extracelular y/o de los organelos intracelulares que lo almacenan. El flujo de calcio a través de la membrana plasmática y las endomembranas depende de varios canales de calcio que se encuentran en las membranas celulares.

Algunas de las primeras células aparecieron en el océano primitivo en donde los elementos principales eran iones derivados de las sales de la corteza terrestre (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} y Mg^{2+}); no se conocen con exactitud las concentraciones de estos iones en el océano primitivo, sin embargo, algunos paleontólogos sugieren que la concentración de Ca^{2+} era muy baja y cercana a 100 nM, y por lo tanto las primeras células habrían adquirido un contenido muy bajo de Ca^{2+} en sus citoplasmas. Prueba de ello es que actualmente organismos como las cianobacterias (que probablemente son los organismos más antiguos en la actualidad) tienen un bajo requerimiento de Ca^{2+} y son alcalófilos (alto requerimiento de sodio) (Kazmierczak, Zhang et al. 2013).

Una amplia maquinaria de señalización por Ca^{2+} probablemente habría evolucionado a principios de la raíz de los eucariotas antes de la divergencia de los principales supergrupos eucariontes. Los animales y los hongos divergieron de un antepasado unicelular común del clado de Opisthokonta, hace aproximadamente

mil millones de años (Ruiz-Trillo, Burger et al. 2007). En el linaje que conduce a los animales, la maquinaria ancestral de señalización de Ca_{2+} está altamente conservada. Por el contrario, los mecanismos de señalización de Ca_{2+} en la mayoría de los protistas, plantas y hongos modernos presentan pérdidas genéticas sustanciales. No obstante, la evidencia de la presencia de una maquinaria ancestral extensa de señalización de Ca_{2+} todavía se puede encontrar en pocos protistas como *Aurantiochytrium limacinum* y *Thecamonas trahens* (Cai, Wang et al. 2014).

Los canales Cav de cuatro dominios son una parte integral de la maquinaria de señalización del Ca_{2+} en los animales. Similar a los canales de sodio de cuatro dominios en los animales, los poros conductores de iones residen en el centro del polipéptido grande que atraviesa la membrana plasmática (Armstrong y Hille 1998). Alineados por los segmentos transmembranales cada dominio contribuye al poro central, con los cuatro módulos de detección del voltaje dispuestos simétricamente alrededor del poro central. Se tiene la hipótesis de que los canales de calcio de cuatro dominios surgieron de un canal ancestral común de un solo dominio con un gen de dominio único primordial que se sometió a una duplicación interna para crear una estructura de dos dominios y una segunda duplicación interna dio lugar a la estructura de cuatro dominios que hoy se conoce. Por lo tanto, los dominios I y III, así como los dominios II y IV, siguen siendo más similares entre sí como resultado de su historia evolutiva (Strong, Chandy et al. 1993). Una implicación de este esquema es que un péptido ancestral de dos dominios era capaz de producir una proteína de canal funcional, ya que existía el tiempo suficiente tanto para que ocurriera una divergencia sustancial de secuencia como para dar lugar a la estructura de cuatro dominios mediante una duplicación adicional; (Isacoff, Jan et al. 1990) mostraron que los dímeros de la cabeza a la cola de las proteínas de canales de potasio de las moscas y los mamíferos son capaces de formar canales funcionales y diversos.

Parece que los canales Kv , Cav y Nav probablemente surgen de un solo dominio de sensor de voltaje acoplado a un dominio de poros $S5/S6$ (Strong, Chandy et al. 1993). A pesar de que la mayoría de los protistas modernos, plantas y hongos

tienden a exhibir redes simplificadas de señalización de Ca^{2+} , los rastros de sistemas de señalización de Ca^{2+} relativamente conservados están presentes en algunas especies básicamente divergentes, como el hongo basal *Allomyces macrogynus* (Cai y Clapham 2012) y el alga basal divergente *Cyanophora paradoxa* (Cai, Wang et al. 2015).

Los fragmentos amplificados de los ADNc de los canales de calcio de la familia Cav2 de *T. scripta elegans* en este trabajo muestran similitud con los grupos de vertebrados en el alineamiento de secuencias, lo cual sugiere que esta especie de tortuga concuerda con el ancestro común antes mencionado en la filogenia tomando como referencia el estudio de la evolución de los canales de calcio de Cav2. Se estima que las tortugas divergieron como grupo independiente hace 260 millones de años (Zug 2019), y pese a ello, la señalización y proteínas participantes se encuentran altamente conservadas.

La supervivencia de los animales durante la anoxia se ve reforzada por una variedad de adaptaciones bioquímicas incluyendo vías fermentativas de producción de energía y lo más importante, la capacidad de reducir drásticamente la tasa metabólica 5–20 veces y entrar en un estado hipometabólico. La regulación bioquímica del paro metabólico está demostrando tener principios moleculares comunes que se extienden a través de líneas filogenéticas y que se conservan en diferentes tipos de estados detenidos (no sólo anaerobiosis sino también estivación, hibernación, etc.). Estudios con *T. scripta elegans* han identificado una variedad de mecanismos reguladores, involucrados tanto en la depresión de la tasa metabólica como en el proceso de recuperación aeróbica: la modificación post-traducciona l de proteínas celulares y funcionales por fosforilación reversible y cambios en las actividades de proteín-cinasas y fosfatasa s para regular esto, asociaciones reversibles de unión a enzimas con elementos estructurales subcelulares, diferencias en la expresión génica y procesamiento del ARN que producen nuevas variantes de ARNm y nuevos productos proteínicos, cambios en la actividad de proteasas y modificaciones tanto constitutivas como anóxicas de sistemas

antioxidantes celulares, para tratar el estrés oxidativo durante la transición anóxico-aeróbica (Storey 1996). Bickler en 1998 obtuvo pruebas directas de la inactivación de los canales de Ca^{2+} en cortes anóxicos de corteza de tortuga, aunque aún no se conocen los mecanismos moleculares implicados en estas acciones.

Hasta ahora en los fragmentos clonados de los ADNc de tortuga *T. scripta elegans* no se observan diferencias significativas en las secuencias de las subunidades α_1A , α_1B y α_1E de los canales de calcio.

VII. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos de las amplificaciones de los ADNc de los canales de calcio de la familia Cav2 de la tortuga *T. scripta elegans* evidencian la similitud que éstos tienen con las secuencias de proteínas homólogas de otros vertebrados.

Hasta ahora se sugiere que la especie *T. scripta elegans* es un buen modelo de estudio para las neurociencias, siendo necesario llevar a cabo la clonación completa de las subunidades de la familia Cav2, lo cual permitirá identificar los cambios biofísicos, farmacológicas y estructurales que dichos canales presentan en este organismo con respecto a los canales de calcio dependientes de voltaje de los mamíferos.

Así también, un estudio más extenso con la clonación completa de estos canales nos abrirá el panorama acerca de las cuestiones evolutivas en las que las tortugas están implicadas, tomando en cuenta el funcionamiento de su metabolismo a las condiciones de anoxia a las que se pueden adaptar.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Adams, M. E., R. A. Myers, J. S. Imperial y B. M. Olivera (1993). "Toxotyping rat brain calcium channels with omega-toxins from spider and cone snail venoms." *Biochemistry* **32**(47): 12566-12570.

Adams, P. J. y T. P. Snutch (2007). "Calcium channelopathies: voltage-gated calcium channels." *Subcell Biochem* **45**: 215-251.

Alberts, B. (2006). *Introducción a la biología celular*. Buenos Aires. Argentina, Medica Panamericana.

Andreoli, T. E. H., J. F.; Fanestil, D. D.; Schultz, S. G. (1986). *Membrane transport processes in organized systems*. 233 Spring Street, New York, N.Y. 10013, Plenum Medical Book Company.

Armstrong, C. M. y B. Hille (1998). "Voltage-gated ion channels and electrical excitability." *Neuron* **20**(3): 371-380.

Barral, J., S. Toro, E. Galarraga y J. Bargas (2000). "GABAergic presynaptic inhibition of rat neostriatal afferents is mediated by Q-type Ca(2+) channels." *Neurosci Lett* **283**(1): 33-36.

Bean, B. P. (1985). "Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology." *J Gen Physiol* **86**(1): 1-30.

Berjukow, S., R. Marksteiner, S. Sokolov, R. G. Weiss, E. Margreiter y S. Hering (2001). "Amino acids in segment IVS6 and beta-subunit interaction support distinct conformational changes during Ca(v)2.1 inactivation." *J Biol Chem* **276**(20): 17076-17082.

Bers, D. M. (2002). "Cardiac excitation-contraction coupling." *Nature* **415**(6868): 198-205.

Beuckmann, C. T., C. M. Sinton, N. Miyamoto, M. Ino y M. Yanagisawa (2003). "N-type calcium channel alpha1B subunit (Cav2.2) knock-out mice display hyperactivity and vigilance state differences." *J Neurosci* **23**(17): 6793-6797.

Bickler, P. E. (1992). "Cerebral anoxia tolerance in turtles: regulation of intracellular calcium and pH." *Am J Physiol* **263**(6 Pt 2): R1298-1302.

Bickler, P. E. (1998). "Reduction of NMDA receptor activity in cerebrocortex of turtles (*Chrysemys picta*) during 6 wk of anoxia." *Am J Physiol* **275**(1): R86-91.

Bickler, P. E. y P. H. Donohoe (2002). "Adaptive responses of vertebrate neurons to hypoxia." *J Exp Biol* **205**(Pt 23): 3579-3586.

Buraei, Z. y J. Yang (2010). "The α_1 subunit of voltage-gated Ca^{2+} channels." *Physiol Rev* **90**(4): 1461-1506.

Buraei, Z. y J. Yang (2013). "Structure and function of the beta subunit of voltage-gated Ca^{2+} channels." *Biochim Biophys Acta* **1828**(7): 1530-1540.

Cai, X. y D. E. Clapham (2012). "Ancestral Ca^{2+} signaling machinery in early animal and fungal evolution." *Mol Biol Evol* **29**(1): 91-100.

Cai, X., X. Wang y D. E. Clapham (2014). "Early evolution of the eukaryotic Ca^{2+} signaling machinery: conservation of the CatSper channel complex." *Mol Biol Evol* **31**(10): 2735-2740.

Cai, X., X. Wang, S. Patel y D. E. Clapham (2015). "Insights into the early evolution of animal calcium signaling machinery: a unicellular point of view." *Cell Calcium* **57**(3): 166-173.

Canto-Bustos, M., E. Loeza-Alcocer, R. Gonzalez-Ramirez, M. A. Gandini, R. Delgado-Lezama y R. Felix (2014). "Functional expression of T-type Ca^{2+} channels in spinal motoneurons of the adult turtle." *PLoS One* **9**(9): e108187.

Carbone, E. y H. D. Lux (1984). "A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones." *Nature* **310**(5977): 501-502.

Castro, A., J. Aguilar, D. Elias, R. Felix y R. Delgado-Lezama (2007). "G-protein-coupled GABAB receptors inhibit Ca^{2+} channels and modulate transmitter release in descending turtle spinal cord terminal synapsing motoneurons." *J Comp Neurol* **503**(5): 642-654.

Catterall, W. A. (2000). "Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels." *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 521-555.

Catterall, W. A. (2011). "Voltage-gated calcium channels." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(8): a003947.

Catterall, W. A. y A. P. Few (2008). "Calcium channel regulation and presynaptic plasticity." *Neuron* **59**(6): 882-901.

Catterall, W. A., E. Perez-Reyes, T. P. Snutch y J. Striessnig (2005). "International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels." *Pharmacol Rev* **57**(4): 411-425.

Cornet, V., D. Bichet, G. Sandoz, I. Marty, J. Brocard, E. Bourinet, Y. Mori, M. Villaz y M. De Waard (2002). "Multiple determinants in voltage-dependent P/Q calcium channels control their retention in the endoplasmic reticulum." *Eur J Neurosci* **16**(5): 883-895.

Day, N. C., P. J. Shaw, A. L. McCormack, P. J. Craig, W. Smith, R. Beattie, T. L. Williams, S. B. Ellis, P. G. Ince, M. M. Harpold, D. Lodge y S. G. Volsen (1996). "Distribution of alpha

1A, alpha 1B and alpha 1E voltage-dependent calcium channel subunits in the human hippocampus and parahippocampal gyrus." *Neuroscience* **71**(4): 1013-1024.

Doering, C. J. y G. W. Zamponi (2003). "Molecular pharmacology of high voltage-activated calcium channels." *J Bioenerg Biomembr* **35**(6): 491-505.

Ellis, S. B., M. E. Williams, N. R. Ways, R. Brenner, A. H. Sharp, A. T. Leung, K. P. Campbell, E. McKenna, W. J. Koch, A. Hui y et al. (1988). "Sequence and expression of mRNAs encoding the alpha 1 and alpha 2 subunits of a DHP-sensitive calcium channel." *Science* **241**(4873): 1661-1664.

Engbrecht, J., R. Brent y M. A. Kaderbhai (2001). "Minipreps of plasmid DNA." *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 1**: Unit1 6.

Ertel, E. A., K. P. Campbell, M. M. Harpold, F. Hofmann, Y. Mori, E. Perez-Reyes, A. Schwartz, T. P. Snutch, T. Tanabe, L. Birnbaumer, R. W. Tsien y W. A. Catterall (2000). "Nomenclature of voltage-gated calcium channels." *Neuron* **25**(3): 533-535.

Evans, R. M. y G. W. Zamponi (2006). "Presynaptic Ca²⁺ channels--integration centers for neuronal signaling pathways." *Trends Neurosci* **29**(11): 617-624.

Fabiato, A. (1983). "Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum." *Am J Physiol* **245**(1): C1-14.

Felix, R., C. A. Gurnett, M. De Waard y K. P. Campbell (1997). "Dissection of functional domains of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha2delta subunit." *J Neurosci* **17**(18): 6884-6891.

Flavell, S. W. y M. E. Greenberg (2008). "Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system." *Annu Rev Neurosci* **31**: 563-590.

Fox, A. P., M. C. Nowycky y R. W. Tsien (1987). "Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones." *J Physiol* **394**: 173-200.

Guerin, A. A., A. Feigenbaum, E. J. Donner y G. Yoon (2008). "Stepwise developmental regression associated with novel CACNA1A mutation." *Pediatr Neurol* **39**(5): 363-364.

Gurnett, C. A., M. De Waard y K. P. Campbell (1996). "Dual function of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha 2 delta subunit in current stimulation and subunit interaction." *Neuron* **16**(2): 431-440.

Hagiwara, N., H. Irisawa y M. Kameyama (1988). "Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells." *J Physiol* **395**: 233-253.

Hans, M., A. Urrutia, C. Deal, P. F. Brust, K. Stauderman, S. B. Ellis, M. M. Harpold, E. C. Johnson y M. E. Williams (1999). "Structural elements in domain IV that influence

biophysical and pharmacological properties of human alpha1A-containing high-voltage-activated calcium channels." *Biophys J* **76**(3): 1384-1400.

Hatakeyama, S., M. Wakamori, M. Ino, N. Miyamoto, E. Takahashi, T. Yoshinaga, K. Sawada, K. Imoto, I. Tanaka, T. Yoshizawa, Y. Nishizawa, Y. Mori, T. Niidome y S. Shoji (2001). "Differential nociceptive responses in mice lacking the alpha(1B) subunit of N-type Ca(2+) channels." *Neuroreport* **12**(11): 2423-2427.

Herlitze, S., G. H. Hockerman, T. Scheuer y W. A. Catterall (1997). "Molecular determinants of inactivation and G protein modulation in the intracellular loop connecting domains I and II of the calcium channel alpha1A subunit." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(4): 1512-1516.

Hillman, D., S. Chen, T. T. Aung, B. Cherksey, M. Sugimori y R. R. Llinas (1991). "Localization of P-type calcium channels in the central nervous system." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(16): 7076-7080.

Hochachka, P. W. y P. L. Lutz (2001). "Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals." *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **130**(4): 435-459.

Horne, W. A., P. T. Ellinor, I. Inman, M. Zhou, R. W. Tsien y T. L. Schwarz (1993). "Molecular diversity of Ca²⁺ channel alpha 1 subunits from the marine ray *Discopyge ommata*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(9): 3787-3791.

Imbrici, P., S. L. Jaffe, L. H. Eunson, N. P. Davies, C. Herd, R. Robertson, D. M. Kullmann y M. G. Hanna (2004). "Dysfunction of the brain calcium channel CaV2.1 in absence epilepsy and episodic ataxia." *Brain* **127**(Pt 12): 2682-2692.

Isacoff, E. Y., Y. N. Jan y L. Y. Jan (1990). "Evidence for the formation of heteromultimeric potassium channels in *Xenopus* oocytes." *Nature* **345**(6275): 530-534.

Ishikawa, T., M. Kaneko, H. S. Shin y T. Takahashi (2005). "Presynaptic N-type and P/Q-type Ca²⁺ channels mediating synaptic transmission at the calyx of Held of mice." *J Physiol* **568**(Pt 1): 199-209.

Jen, J., G. W. Kim y R. W. Baloh (2004). "Clinical spectrum of episodic ataxia type 2." *Neurology* **62**(1): 17-22.

Jeng, C. J., M. C. Sun, Y. W. Chen y C. Y. Tang (2008). "Dominant-negative effects of episodic ataxia type 2 mutations involve disruption of membrane trafficking of human P/Q-type Ca²⁺ channels." *J Cell Physiol* **214**(2): 422-433.

Jing, X., D. Q. Li, C. S. Olofsson, A. Salehi, V. V. Surve, J. Caballero, R. Ivarsson, I. Lundquist, A. Pereverzev, T. Schneider, P. Rorsman y E. Renstrom (2005). "CaV2.3 calcium channels control second-phase insulin release." *J Clin Invest* **115**(1): 146-154.

Jouveneau, A., L. H. Eunson, A. Spauschus, V. Ramesh, S. M. Zuberi, D. M. Kullmann y M. G. Hanna (2001). "Human epilepsy associated with dysfunction of the brain P/Q-type calcium channel." *Lancet* **358**(9284): 801-807.

Jun, K., E. S. Piedras-Renteria, S. M. Smith, D. B. Wheeler, S. B. Lee, T. G. Lee, H. Chin, M. E. Adams, R. H. Scheller, R. W. Tsien y H. S. Shin (1999). "Ablation of P/Q-type Ca(2+) channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the alpha(1A)-subunit." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(26): 15245-15250.

Kazmierczak, M., X. Zhang, B. Chen, D. K. Mulkey, Y. Shi, P. G. Wagner, K. Pivaroff-Ward, J. K. Sassic, D. A. Bayliss y T. Jegla (2013). "External pH modulates EAG superfamily K⁺ channels through EAG-specific acidic residues in the voltage sensor." *J Gen Physiol* **141**(6): 721-735.

Kim, C., K. Jun, T. Lee, S. S. Kim, M. W. McEnery, H. Chin, H. L. Kim, J. M. Park, D. K. Kim, S. J. Jung, J. Kim y H. S. Shin (2001). "Altered nociceptive response in mice deficient in the alpha(1B) subunit of the voltage-dependent calcium channel." *Mol Cell Neurosci* **18**(2): 235-245.

Kim, Y. E. F., F.; Minor, L.D. (2010). Calmodulin interactions with Cav1 and Cav2 voltage-gated calcium channel IQ domains. *Handbook of Metalloproteins*, Wiley.

Kipfer, S., S. Jung, J. R. Lemke, A. Kipfer-Kauer, J. P. Howell, A. Kaelin-Lang, T. Nyffeler, K. Gutbrod, A. Abicht y R. M. Muri (2013). "Novel CACNA1A mutation(s) associated with slow saccade velocities." *J Neurol* **260**(12): 3010-3014.

Lacinova, L. (2005). "Voltage-dependent calcium channels." *Gen Physiol Biophys* **24 Suppl 1**: 1-78.

Lacinova, L., N. Klugbauer, M. Hu y F. Hofmann (1999). "Reconstruction of the dihydropyridine site in a non-L-type calcium channel: the role of the IS6 segment." *FEBS Lett* **451**(2): 152-156.

Latorre, R. L.-B., J.; Bezanilla, F.; Linás, R. (1996). *Biofísica y fisiología celular*. Sevilla, Universidad de Sevilla Secretariado de Publicaciones

Lee, A., S. T. Wong, D. Gallagher, B. Li, D. R. Storm, T. Scheuer y W. A. Catterall (1999). "Ca²⁺/calmodulin binds to and modulates P/Q-type calcium channels." *Nature* **399**(6732): 155-159.

Leon-Iza, M. Z.-H., A. (2010) "El ion calcio como segundo mensajero en el desarrollo del sistema nervioso." **Enero-Junio 2011**, 32-39.

Llinas, R., M. Sugimori, J. W. Lin, P. L. Leopold y S. T. Brady (1989). "ATP-dependent directional movement of rat synaptic vesicles injected into the presynaptic terminal of squid giant synapse." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(14): 5656-5660.

Llinas, R. y Y. Yarom (1981). "Properties and distribution of ionic conductances generating electroresponsiveness of mammalian inferior olivary neurones in vitro." *J Physiol* **315**: 569-584.

Lodish, H. B., A.; Matsuidaira, P.; Kaiser, C. A.; Krieger, M.; Zipursky, S. L.; Darnell, J. (2012). *Biología celular y molecular*. Buenos Aires. Argentina, Medica Panamericana.

Lopez, E. (2015). *Modulación de los canales de calcio presinápticos por variantes de receptores acoplados a proteína G humanos: el receptor opioide mu y el receptor de ghrelina*. Doctor en Ciencias Naturales, Universidad Nacional de La Plata Facultad de Ciencias Naturales y Museo.

Lory, P., R. A. Ophoff y J. Nahmias (1997). "Towards a unified nomenclature describing voltage-gated calcium channel genes." *Hum Genet* **100**(2): 149-150.

Lutz, P. L. y S. L. Milton (2004). "Negotiating brain anoxia survival in the turtle." *J Exp Biol* **207**(Pt 18): 3141-3147.

Mark, M. D., T. Maejima, D. Kuckelsberg, J. W. Yoo, R. A. Hyde, V. Shah, D. Gutierrez, R. L. Moreno, W. Kruse, J. L. Noebels y S. Herlitz (2011). "Delayed postnatal loss of P/Q-type calcium channels recapitulates the absence epilepsy, dyskinesia, and ataxia phenotypes of genomic Cacna1a mutations." *J Neurosci* **31**(11): 4311-4326.

Martin-Moutot, N., B. Lang, J. Newsom-Davis y M. Seagar (1995). "Binding of Lambert-Eaton myasthenic syndrome IgG to synaptosomal proteins does not correlate with an inhibition of calcium uptake." *Neurosci Lett* **187**(2): 115-118.

Martínez Rosas, M. (2004). *Los canales iónicos: la biología y patología*. Archivos de Cardiología de México. México, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. **74**: 205-210.

McKeown, L., P. Robinson y O. T. Jones (2006). "Molecular basis of inherited calcium channelopathies: role of mutations in pore-forming subunits." *Acta Pharmacol Sin* **27**(7): 799-812.

Metz, A. E., T. Jarsky, M. Martina y N. Spruston (2005). "R-type calcium channels contribute to afterdepolarization and bursting in hippocampal CA1 pyramidal neurons." *J Neurosci* **25**(24): 5763-5773.

Mezghrani, A., A. Monteil, K. Watschinger, M. J. Sinnegger-Brauns, C. Barrere, E. Bourinet, J. Nargeot, J. Striessnig y P. Lory (2008). "A destructive interaction mechanism accounts for dominant-negative effects of misfolded mutants of voltage-gated calcium channels." *J Neurosci* **28**(17): 4501-4511.

Moreno, H. M., C. B.; (2005). *Transmisión sináptica-canales de calcio y liberación de neurotransmisores*. Revista Ciencias de la Salud. Bogotá, Colombia, Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. **3**: 47-61.

Moreno, I. (2016). Clonación del extremo 3' de la subunidad A1A del canal de Ca²⁺ dependiente del voltaje CaV2.1 de la tortuga *Trachemys scripta elegans*. Bióloga, Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM.

Mori, Y., M. Nishida, S. Shimizu, M. Ishii, T. Yoshinaga, M. Ino, K. Sawada y T. Niidome (2002). "Ca(2+) channel alpha(1B) subunit (Ca(V) 2.2) knockout mouse reveals a predominant role of N-type channels in the sympathetic regulation of the circulatory system." *Trends Cardiovasc Med* **12**(6): 270-275.

Mould, J., T. Yasuda, C. I. Schroeder, A. M. Beedle, C. J. Doering, G. W. Zamponi, D. J. Adams y R. J. Lewis (2004). "The alpha2delta auxiliary subunit reduces affinity of omega-conotoxins for recombinant N-type (Cav2.2) calcium channels." *J Biol Chem* **279**(33): 34705-34714.

Murakami, M., B. Fleischmann, C. De Felipe, M. Freichel, C. Trost, A. Ludwig, U. Wissenbach, H. Schwegler, F. Hofmann, J. Hescheler, V. Flockerzi y A. Cavalie (2002). "Pain perception in mice lacking the beta3 subunit of voltage-activated calcium channels." *J Biol Chem* **277**(43): 40342-40351.

Niidome, T., M. S. Kim, T. Friedrich y Y. Mori (1992). "Molecular cloning and characterization of a novel calcium channel from rabbit brain." *FEBS Lett* **308**(1): 7-13.

Nimmrich, V. y G. Gross (2012). "P/Q-type calcium channel modulators." *Br J Pharmacol* **167**(4): 741-759.

Nowycky, M. C., A. P. Fox y R. W. Tsien (1985). "Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity." *Nature* **316**(6027): 440-443.

Ophoff, R. A., G. M. Terwindt, M. N. Vergouwe, R. van Eijk, P. J. Oefner, S. M. Hoffman, J. E. Lamerdin, H. W. Mohrenweiser, D. E. Bulman, M. Ferrari, J. Haan, D. Lindhout, G. J. van Ommen, M. H. Hofker, M. D. Ferrari y R. R. Frants (1996). "Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNL1A4." *Cell* **87**(3): 543-552.

Perez-Reyes, E. (2003). "Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels." *Physiol Rev* **83**(1): 117-161.

Pietrobon, D. (2002). "Calcium channels and channelopathies of the central nervous system." *Mol Neurobiol* **25**(1): 31-50.

Pietrobon, D. (2010). "CaV2.1 channelopathies." *Pflugers Arch* **460**(2): 375-393.

Pietrobon, D. y M. A. Moskowitz (2013). "Pathophysiology of migraine." *Annu Rev Physiol* **75**: 365-391.

Randall, A. y R. W. Tsien (1995). "Pharmacological dissection of multiple types of Ca²⁺ channel currents in rat cerebellar granule neurons." *J Neurosci* **15**(4): 2995-3012.

- Restituto, S., R. M. Thompson, J. Eliet, R. S. Raike, M. Riedl, P. Charnet y C. M. Gomez (2000). "The polyglutamine expansion in spinocerebellar ataxia type 6 causes a beta subunit-specific enhanced activation of P/Q-type calcium channels in *Xenopus* oocytes." *J Neurosci* **20**(17): 6394-6403.
- Rose, T. M., J. G. Henikoff y S. Henikoff (2003). "CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design." *Nucleic Acids Res* **31**(13): 3763-3766.
- Rosich, P. (2008). Canalopatías autoinmunes del sistema nervioso central. Doctor Tesis Doctoral, Universidad de Barcelona.
- Rueda, A. D. A.-A., D. R.; Valdivia H. H. (2014). "Receptor de rianodina, fuga de calcio y arritmias." *Archivos de cardiología de México* **84**: 191-201.
- Ruiz-Trillo, I., G. Burger, P. W. Holland, N. King, B. F. Lang, A. J. Roger y M. W. Gray (2007). "The origins of multicellularity: a multi-taxon genome initiative." *Trends Genet* **23**(3): 113-118.
- Russo, E. (2014). "¿Qué investigamos en el IIBCE? La regeneración de la Médula Espinal " Blog del IIBCE <https://elblogdeliibce.wordpress.com/tag/salud/page/3/>.
- Saegusa, H., T. Kurihara, S. Zong, A. Kazuno, Y. Matsuda, T. Nonaka, W. Han, H. Toriyama y T. Tanabe (2001). "Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca²⁺ channel." *EMBO J* **20**(10): 2349-2356.
- Saegusa, H., Y. Matsuda y T. Tanabe (2002). "Effects of ablation of N- and R-type Ca(2+) channels on pain transmission." *Neurosci Res* **43**(1): 1-7.
- Sanger, F., S. Nicklen y A. R. Coulson (1992). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977." *Biotechnology* **24**: 104-108.
- Sather, W. A., T. Tanabe, J. F. Zhang, Y. Mori, M. E. Adams y R. W. Tsien (1993). "Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (BI) calcium channel alpha 1 subunits." *Neuron* **11**(2): 291-303.
- Serra-Pages, C., Q. G. Medley, M. Tang, A. Hart y M. Streuli (1998). "Liprins, a family of LAR transmembrane protein-tyrosine phosphatase-interacting proteins." *J Biol Chem* **273**(25): 15611-15620.
- Silverthorn, D. (2009). Fisiología humana: un enfoque integrado. Buenos Aires. Argentina, Medica Panamericana.
- Simms, B. A. y G. W. Zamponi (2014). "Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction." *Neuron* **82**(1): 24-45.
- Snutch, T. P. P., J.; Mathews E. (2013). Molecular properties of voltage-gated calcium channels. Austin Texas, Madame Curie Bioscience Database.

Soldatov, N. M., R. D. Zuhlke, A. Bouron y H. Reuter (1997). "Molecular structures involved in L-type calcium channel inactivation. Role of the carboxyl-terminal region encoded by exons 40-42 in alpha1C subunit in the kinetics and Ca²⁺ dependence of inactivation." *J Biol Chem* **272**(6): 3560-3566.

Soong, T. W., A. Stea, C. D. Hodson, S. J. Dubel, S. R. Vincent y T. P. Snutch (1993). "Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family." *Science* **260**(5111): 1133-1136.

Storey, K. B. (1996). "Oxidative stress: animal adaptations in nature." *Braz J Med Biol Res* **29**(12): 1715-1733.

Storey, K. B. (2007). "Anoxia tolerance in turtles: metabolic regulation and gene expression." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **147**(2): 263-276.

Strong, M., K. G. Chandy y G. A. Gutman (1993). "Molecular evolution of voltage-sensitive ion channel genes: on the origins of electrical excitability." *Mol Biol Evol* **10**(1): 221-242.

Su, S. C., J. Seo, J. Q. Pan, B. A. Samuels, A. Rudenko, M. Ericsson, R. L. Neve, D. T. Yue y L. H. Tsai (2012). "Regulation of N-type voltage-gated calcium channels and presynaptic function by cyclin-dependent kinase 5." *Neuron* **75**(4): 675-687.

Sudhof, T. C. (2004). "The synaptic vesicle cycle." *Annu Rev Neurosci* **27**: 509-547.

Sudhof, T. C. (2013). "Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle." *Neuron* **80**(3): 675-690.

Takahashi, M., M. J. Seagar, J. F. Jones, B. F. Reber y W. A. Catterall (1987). "Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(15): 5478-5482.

Tamargo, J. M. (2004). Los poros y los canales iónicos regulan la actividad celular. Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia. **70**: 9-31.

Tang, C. M., F. Presser y M. Morad (1988). "Amiloride selectively blocks the low threshold (T) calcium channel." *Science* **240**(4849): 213-215.

Tottene, A., R. Conti, A. Fabbro, D. Vecchia, M. Shapovalova, M. Santello, A. M. van den Maagdenberg, M. D. Ferrari y D. Pietrobon (2009). "Enhanced excitatory transmission at cortical synapses as the basis for facilitated spreading depression in Ca(v)2.1 knockin migraine mice." *Neuron* **61**(5): 762-773.

Urbano, F. J., E. S. Piedras-Renteria, K. Jun, H. S. Shin, O. D. Uchitel y R. W. Tsien (2003). "Altered properties of quantal neurotransmitter release at endplates of mice lacking P/Q-type Ca²⁺ channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(6): 3491-3496.

- Venkatakrishnan, A. J., X. Deupi, G. Lebon, C. G. Tate, G. F. Schertler y M. M. Babu (2013). "Molecular signatures of G-protein-coupled receptors." *Nature* **494**(7436): 185-194.
- Wan, J., R. Khanna, M. Sandusky, D. M. Papazian, J. C. Jen y R. W. Baloh (2005). "CACNA1A mutations causing episodic y progressive ataxia alter channel trafficking y kinetics." *Neurology* **64**(12): 2090-2097.
- Weiergraber, M., M. Henry, K. Radhakrishnan, J. Hescheler y T. Schneider (2007). "Hippocampal seizure resistance and reduced neuronal excitotoxicity in mice lacking the Cav2.3 E/R-type voltage-gated calcium channel." *J Neurophysiol* **97**(5): 3660-3669.
- Wolf, J. B. (2013). "Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: an RNA-seq tutorial." *Mol Ecol Resour* **13**(4): 559-572.
- Yaari, Y., B. Hamon y H. D. Lux (1987). "Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons." *Science* **235**(4789): 680-682.
- Yang, S. N. y P. O. Berggren (2006). "The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic beta-cell physiology and pathophysiology." *Endocr Rev* **27**(6): 621-676.
- Yokoyama, C. T., R. E. Westenbroek, J. W. Hell, T. W. Soong, T. P. Snutch y W. A. Catterall (1995). "Biochemical properties and subcellular distribution of the neuronal class E calcium channel alpha 1 subunit." *J Neurosci* **15**(10): 6419-6432.
- Zamponi, G. W. y K. P. Currie (2013). "Regulation of Ca(V)₂ calcium channels by G protein coupled receptors." *Biochim Biophys Acta* **1828**(7): 1629-1643.
- Zhuchenko, O., J. Bailey, P. Bonnen, T. Ashizawa, D. W. Stockton, C. Amos, W. B. Dobyns, S. H. Subramony, H. Y. Zoghbi y C. C. Lee (1997). "Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel." *Nat Genet* **15**(1): 62-69.
- Zug, G. R. (2019). Turtle. Encyclopædia Britannica Encyclopædia Britannica, inc. .