



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

LA CALPAÍNA 5 NO PROTEOLIZA CANALES DE SODIO $Na_v1.7$

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ALEXANDRA ESTHER RAMÍREZ RIVERA

TUTORA: DRA. ANA VICTORIA VEGA SALCEDO

(FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. DAVID ERASMO GARCÍA DÍAZ (FACULTAD DE MEDICINA)

DR. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES (INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA)

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO. AGOSTO DE 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca que me fue otorgada durante el curso de esta maestría.

A la UNAM, al programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y a todo el personal académico y administrativo al frente de dicho programa, por brindarme todas las facilidades para formarme en el campo de la Neurobiología.

A los amantes del conocimiento de la *bios* y sus asombrosos mecanismos. A aquellos que nos precedieron y legaron tan magnífico conocimiento. Porque a mi modo de ver, tal conocimiento representa la promesa más honesta de un mejor mañana.

A la Dra. Ana Vega, por haberme acogido siempre con enorme comprensión, respeto y cariño, no importando las circunstancias limitantes o adversas a las que nos enfrentamos. Gracias por darme la oportunidad de formar parte del grupo de trabajo más genial, liderado por la investigadora más genial. Gracias por su guía paciente, cuidadosa y entusiasta, por el aliento que sabe infundirme cada vez. Gracias por su increíble ejemplo de compromiso y vocación en todos los aspectos. Gracias por las muchas, muchas horas que me dedicó en estos casi tres años. Gracias por las risas y los gestos de amistad que me obsequió; los atesoro muchísimo. Gracias por haber compartido conmigo y con mis compañeros un montón de lecciones de toda índole; me encanta creer que todas ellas cristalizarán en mi futuro cercano.

Al Dr. Villalobos y demás responsables del L-7 de la UBIMED, por todas las facilidades prestadas para realizar nuestros experimentos en su laboratorio.

A Lore, por el amor y la alegría inmensos que viertes en nuestro hogar todos los días. Gracias por tu cuidado y tu apoyo tan generosos. Valoro enormemente tu esfuerzo diario por comprenderme e impulsarme. Gracias infinitas por confiar en mí y en todo lo maravilloso que nos espera.

A Gris y Tania, mis luceros. Ustedes y Julia son mi motivación, mi fuerza, mi orgullo, mi meta, mi fuente de confianza y esperanza. Gracias hasta el fin de los tiempos.

A Lupis. Por la mirada cálida y la escucha afectuosa que tiene siempre para mí. Gracias por tanto cariño y por todos sus cuidados. Es para mí un refugio de tremendo valor. Gracias por creer en mí y por ser motivo de mis esfuerzos y mis sonrisas. Gracias por tenerme en sus oraciones de todos los días.

A Víctor, por tu cariño, por cuidar de mí y por la fe que me tienes. Gracias por acompañarme en este proceso, pues, aunque físicamente estemos lejos, te mantienes cercano y pendiente de mí.

A Marga, Pepe, Nacho y Ben, mis padres segundos, por ser guías y protectores. Por ser mis ejemplos a seguir.

A Lupita, mi abue, por tener cuidado de mí. Por sus palabras de aliento de cada semana. Por la alegría, el ingenio y la viveza que me regala en cada plática.

A Dany, Andy, Karen, Sami y Emilio, por ser mis confidentes y por inspirarme cada vez que nos reunimos, y por la diversión asegurada con ustedes.

A mi familia entera, los Ramírez y los Rivera; son un fundamento precioso para mí.

A Isra, Pablo, Juli y Tavira, por su amistad y su afecto. Aprecio mucho su contribución a lo que soy, lo que tengo y lo que he logrado.

A mis compañeros del A4-L4: Julio, Luis, Jessica, Saraí, Edgardo, Sergio, Emmanuel, Yazmín, Michelle, Paola, Diego, Andrés y al Dr. Oskar, por los ratos de aprendizaje y diversión compartidos.

A Erik, mi cómplice estrella en esta aventura neurobiológica. Gracias por tu disposición a ayudar en todo momento, por tus explicaciones y por tu amistad. Gracias por todos los lunches que compartimos. A Diane, Dana, Daniel y los demás compañeros de la maestría.

A mis tutores del comité, el Dr. David García y el Dr. Ataúlfo Martínez, por su acompañamiento y su dedicada colaboración durante los dos años del posgrado.

A la Dra. Linda Garcés por su apoyo como revisora de la tesis.

Al Dr. Lenin Ochoa y al Dr. Manuel Aguilar, por su esmerada contribución durante la última etapa de este trabajo.

A Xochitl, Pamela, Mafer, Rodrigo, Mariana y Mariana, Ana, Chela, Danger, por ser mis aliados de vida. Por estar siempre para impulsarme, para celebrar y para soñar y reír a lo bárbaro conmigo.

A Lalo, por las tardes de inspiración compartidas.

A Edna, tan profesional y ética. Has sido una enorme ayuda, y confío en que seremos invencibles.

A mis chispitas de sol: Lola, Frijol, Lalita y Gus.

Al valerosísimo espíritu que en mí habita.

Índice

1. Resumen.	6
2. Introducción.....	8
2.1 Canales iónicos.	8
2.1.1 Canales iónicos regulados por voltaje.	9
2.1.2 Canales de sodio. Diversidad y distribución.....	10
2.1.3 Los canales de sodio tienen un papel en diversos trastornos neurológicos.....	12
2.2 Calpaínas.....	15
2.2.1 Estructura, función y clasificación.....	15
2.2.2 Las calpaínas están involucradas en varias neuropatologías.	17
2.2.3 Calpaína 5. Participación en el desarrollo de retinopatías.	18
3. Antecedentes.	19
3.1 Evidencias de la interacción de calpaínas y canales de sodio.	19
3.2. N1E-115 como modelo de estudio.....	20
4. Justificación.....	21
5. Planteamiento del problema.	22
6. Hipótesis.	22
7. Objetivos.	23
8. Materiales y métodos.	23
8.1 Cultivo de células de neuroblastoma N1E-115.	23
8.2 Clonación de calpaína 5.	23
8.2.1 Diseño de oligonucleótidos (<i>primers</i>).....	23
8.2.2 PCR y producción de la construcción pEGFP-Capn5.....	26
8.2.3 Transformación de células competentes y selección de transformantes.	27
8.3 Transfección de células N1-E115 con pEGFP-Capn5 y pEGFP.	28
8.4 Obtención de proteína total y <i>western blot</i>	29
8.5 Tratamiento estadístico de los datos.	30
9. Resultados.	31
9.1 Diseño del constructo, clonación y análisis del plásmido pEGFP- Capn5.....	31
9.2 Eficiencia de la transfección con plásmidos recombinantes.....	32
9.3 Expresión de proteínas heterólogas EGFP y EGFP-Capn5.....	35
9.4 Detección de los canales de sodio por <i>western blot</i>	37
9.4.1 Las células N1E-115 no expresan Na _v 1.2 en cantidades detectables.	37
9.4.2 Detección de Na _v 1.7 nativos de las células N1E-115.	40

10. Discusión.....	41
11. Conclusiones.....	48
12. Referencias.....	49

1. Resumen.

Las calpaínas son una familia de proteasas dependientes de calcio capaces de regular la actividad de sus blancos. Entre sus blancos, figuran los canales de sodio dependientes de voltaje (Navs), los cuales tienen una participación esencial en la generación de potenciales de acción en las neuronas. Por ejemplo, se ha observado que en el contexto de la lesión neuronal mecánica la calpaína 1 proteoliza al Nav1.6, modificando la cinética del canal. Sin embargo, en el sistema nervioso la calpaína 5 y la calpaína 2 son más abundantes que la calpaína 1. Asimismo, hay otros canales de sodio que podrían ser blanco de las calpaínas. Sin embargo, esto no se ha investigado. En este trabajo, nos preguntamos si la calpaína 5 puede proteolizar canales de sodio dependientes de voltaje. Para investigar esto, se expresó de manera heteróloga la calpaína 5 en fusión con EGFP en el neuroblastoma N1E-115, y se analizó por *western blot* la integridad de las proteínas de canales de sodio usando anticuerpos específicos para varios subtipos, cuya expresión se había identificado previamente a nivel de mRNA en esta línea celular. De esta forma, encontramos que las células N1E-115 expresan el Nav1.7 a nivel de proteína, mientras que el Nav1.2 fue indetectable en nuestro análisis. Con respecto a la integridad del canal, encontramos que la expresión heteróloga de calpaína 5 no afectó la integridad del Nav1.7. Adicionalmente, se co-transfectaron las células con EGFP-Capn5 y con plásmidos que expresan el carboxilo terminal de los canales de sodio Nav1.2 o Nav1.6; nuevamente, observamos que las proteínas correspondientes permanecieron intactas. Nuestros resultados sugieren que la interacción de canales de sodio con calpaína es específica para las diferentes isoformas, tanto de canales de sodio como de calpaínas.

1. Abstract.

Calpains are a family of calcium-dependent proteases capable of regulating the activity of their targets. Among its targets are voltage-gated sodium channels (Navs), which play an essential role in the generation of action potentials in neurons. For example, it has been observed that in the context of neural mechanical injury, calpain 1 proteolyzes Nav1.6, modifying the kinetics of the channel. However, in the nervous system calpain 5 and calpain 2 are more abundant than calpain 1. Likewise, there are other sodium channels that could be targets of calpains, however this has not been investigated. In this research work, we wonder if calpain 5 can proteolyze voltage-gated sodium channels. To investigate this, calpain 5 in fusion with EGFP was heterologously expressed in neuroblastoma N1E-115, and the integrity of sodium channel proteins was analyzed by western blot using several subtype-specific antibodies, whose expression had been previously identified at the mRNA level in this cell line. Thus, we found that N1E-115 cells express Nav1.7 at the protein level, while Nav1.2 was undetectable in our analysis. Regarding channel integrity, we found that heterologous expression of calpain 5 did not affect Nav1.7 integrity. Additionally, cells were co-transfected with EGFP-Capn5 and with plasmids expressing the C-terminal part of the Nav1.2 or Nav1.6 sodium channels; again, we observed that the corresponding proteins remained intact. Our results suggest that the interaction of sodium channels with calpain is specific for the different isoforms, both sodium channels and calpains.

2. Introducción.

En el sistema nervioso central, los canales de sodio dependientes de voltaje tienen una contribución esencial en la generación y modulación del potencial de membrana, la iniciación y propagación del potencial de acción y en la codificación de la información nerviosa mediante patrones complejos de disparo en neuronas (Catterall, 2015). En los últimos años se ha acumulado evidencia de que los canales de sodio dependientes de voltaje son en realidad complejos multimoleculares (Abriel et al., 2015; Catterall, 2010; Leterrier et al., 2010), lo cual ha atraído una atención creciente hacia el papel que tienen las interacciones con otras proteínas en la regulación de los canales, incluyendo la regulación de sus propiedades biofísicas, su localización subcelular y su presencia en la membrana, así como su posible papel en el desarrollo de varias patologías. Por ejemplo, en el campo del dolor neuropático, la administración del bloqueador de la calpaína MDL28170 previene el incremento de corriente de sodio del tipo resistente a tetrodotoxina (TTX) en las neuronas de la raíz dorsal en un modelo de hiperglucemia (Kharatmal et al., 2015). Sin embargo, se desconoce si dicho efecto se debe a una interacción directa de las calpaínas con los canales de sodio. Más aún, no hay pistas sobre cuál de las 14 calpaínas existentes participa en este fenómeno, ya que el MDL 28170 es un bloqueador inespecífico de las calpaínas. Por otro lado, no se ha estudiado qué efecto tienen las calpaínas sobre otros canales que también se expresan en estas neuronas, como el Nav1.7 (sensible a TTX), a pesar de que la pérdida de función del Nav1.7 resulta en la reducción de la función sensorial y nociceptiva (Grubinska et al., 2019; Xue et al., 2021); y a pesar de que dichas manifestaciones se presentan en un 50% de los individuos afectados por diabetes dentro del cuadro de la neuropatía diabética (Feldman, 2019). Más aún, los ganglios de las raíces dorsales expresan otros canales de sodio sensibles a TTX, como el Nav1.2 (Waxman et al., 1994; Ho & O'Leary, 2011). Por todo lo anterior, pensamos que las interacciones entre estas dos familias merecen ser estudiadas en mayor detalle. En este sentido, en el presente trabajo se exploró la posibilidad de que los canales de sodio Nav1.2 y Nav1.7 sean blancos de la calpaína 5. En los siguientes apartados se exponen detalles acerca de la estructura de los canales de sodio y de las calpaínas, y las evidencias previas de la interacción entre estas dos familias de proteínas, así como las patologías en las que ambas han sido involucradas.

2.1 Canales iónicos.

La excitabilidad y la capacidad de señalización eléctrica que caracterizan a las neuronas son posibles gracias al flujo regulado de iones Na⁺, K⁺, Ca²⁺ y Cl⁻ a través de canales iónicos presentes en la membrana celular (Hille, 2001). Estos canales están constituidos por proteínas transmembranales multiméricas, las cuales se organizan para formar un poro conductor

altamente selectivo para un ión específico, cuyo estado abierto o cerrado está exquisitamente controlado, de modo que los iones atraviesan la membrana a través de estos poros de manera controlada, siempre en función de su gradiente electroquímico. Actualmente, los canales iónicos se clasifican en varias familias con base en la similitud de sus secuencias, pero también tomando en cuenta las señales de apertura (p. ej. canales abiertos por ligando o canales dependientes de voltaje) y el ión que permea a través de ellos, p. ej. canales de sodio dependientes de voltaje (Alexander et al., 2019).

2.1.1 Canales iónicos regulados por voltaje.

Entre 1984 y 1988, tras una serie de trabajos de clonación molecular de las subunidades α que integran el poro de los canales de Na^+ , K^+ y Ca^{+2} regulados por voltaje, se demostró que estos canales poseen estructura general similar (Figura 1) y que pertenecen a la misma superfamilia genética (Armstrong & Hille, 1998).

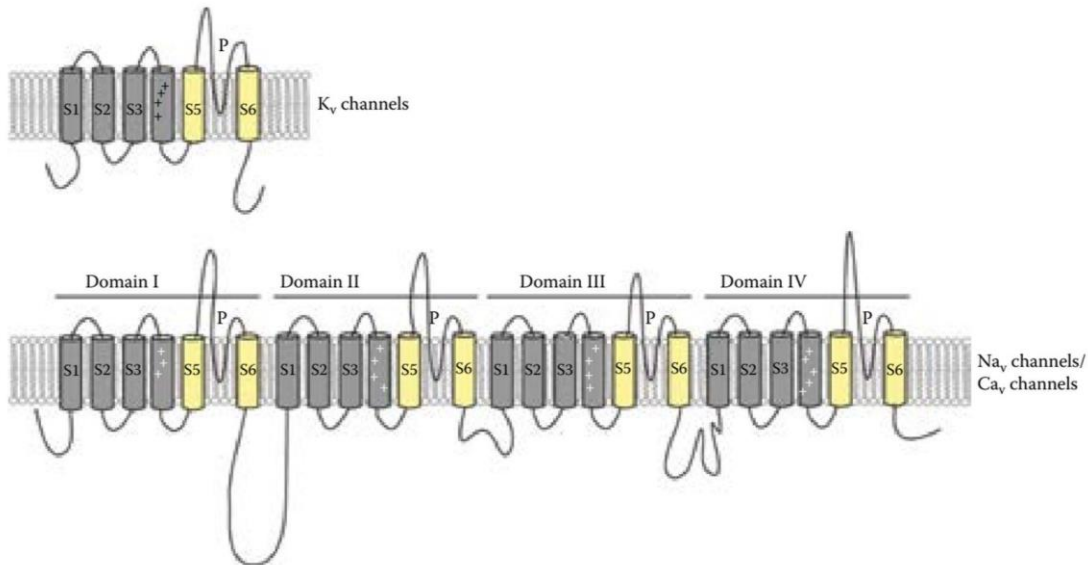


Figura 1. Topología de las subunidades α de los canales de K^+ , Na^+ y Ca^{2+} dependientes de voltaje. Los canales de Na^+ (Nav_s) y los canales de Ca^{2+} (Cav_s) dependientes de voltaje son polipéptidos de alrededor de 2000 aminoácidos que contienen cuatro dominios homólogos (I-IV), cada uno de los cuales consta seis segmentos transmembranales, denominados S1-S6 (Armstrong & Hille, 1998). La subunidad α de los canales de K^+ (Kv_s) dependientes de voltaje contiene solo una serie de segmentos S1-S6, sin embargo, usualmente cuatro de estas subunidades se asocian para formar un homotetrámero. De esta manera, la estructura de los Kv_s , los Nav_s y los Cav_s resulta ser bastante similar (Armstrong & Hille, 1998). (Tomado de: Chowdhury & Chanda, 2015).

Canales iónicos como los de sodio (Navs) y los de calcio (Cavs) usualmente cuentan con una subunidad α que contiene el poro de selectividad, la cual se compone de cuatro dominios homólogos (I-IV) cuya estructura individual está dada por seis segmentos transmembranales (S1-S6) enlazados entre sí por asas polipeptídicas, localizadas ya sea intracelular o extracelularmente. Cada dominio está ligado por asas intracelulares, y los segmentos N-Terminal y C-Terminal (CT y NT) son también intracelulares (Figura 1). El poro está constituido por los segmentos S5 y S6 de cada dominio, a partir de los cuales toma forma un vestíbulo exterior (cara extracelular), una amplia cavidad central llena de agua, y un filtro de selectividad o compuerta superior, así como una compuerta inferior (Zhang et al., 2018). Los segmentos S4 de cada dominio dan lugar al sensor de voltaje, cuya capacidad de detectar cambios en el potencial de membrana se debe a la carga positiva presente en los residuos de aminoácidos que conforman los segmentos S4. En respuesta al cambio de potencial membrana, este sensor de voltaje se desplaza provocando la apertura del canal. Debido a estas características, los canales iónicos dependientes de voltaje pueden inhibirse si se bloquea el poro conductor de iones o mediante la modulación del sensor de voltaje (Zhang et al., 2018).

2.1.2 Canales de sodio. Diversidad y distribución.

La activación de los Navs es el mecanismo responsable del ingreso de corrientes de Na^+ que generan y propagan el potencial de acción en las células eléctricamente excitables. Romey y colaboradores descubrieron que la neurotoxina α del escorpión es capaz de modificar la conductancia iónica y la apertura dependiente de voltaje de los Navs por unión directa con el canal (Romey et al., 1975). Con base en este descubrimiento, Catterall y Beneski en 1980 (Beneski & Catterall, 1980) emplearon un derivado fotorreactivo de la toxina α de escorpión para detectar por foto-afinidad la unidad principal α (260 kDa) y la subunidad auxiliar β (36 kDa) del canal de sodio del cerebro (Catterall, 2012; Catterall, 2000). De esta forma encontraron que el canal de sodio era un complejo multimérico, que consta de una subunidad α integrada a la membrana, una subunidad β_1 unida de forma no covalente, y una unidad β_2 asociada a la subunidad α mediante un enlace disulfuro (Figura 2). Asimismo, encontraron que la subunidad α es necesaria y suficiente para reconstituir la función del canal de sodio regulado por voltaje (Catterall, 2014; Catterall, 2010).

La subunidad α del Nav está constituida por unos 2,000 aminoácidos que forman una estructura general de cuatro dominios homólogos, organizados como se mencionó anteriormente (Catterall, 2014; Wang et al., 2017). Las subunidades β_1 y β_2 constan cada una de un solo segmento transmembranal con un dominio N-terminal (NT) extracelular y un dominio C-terminal (CT) de menor tamaño localizado intracelularmente. β_1 y β_2 funcionan como moduladores de la apertura

de la subunidad α formadora del poro y crecientes evidencias señalan que juegan un papel en la inmovilización y localización específica del Nav en la superficie celular (Catterall, 2017; Srinivasan et al., 1998). Las regiones NT y CT de la subunidad α tienen actividad reguladora de la función electrofisiológica del Nav. Se sabe que el CT participa en el mecanismo de inactivación del canal, y que contiene distintos sitios de interacción con múltiples proteínas y reguladores intracelulares, como el motivo IQ de unión a calmodulina (*CaM-binding*), el motivo PY de unión a la ligasa de ubiquitina Nedd4-like y el motivo 1773-1832 de unión a FHF1B, entre otros (Wang et al., 2017).

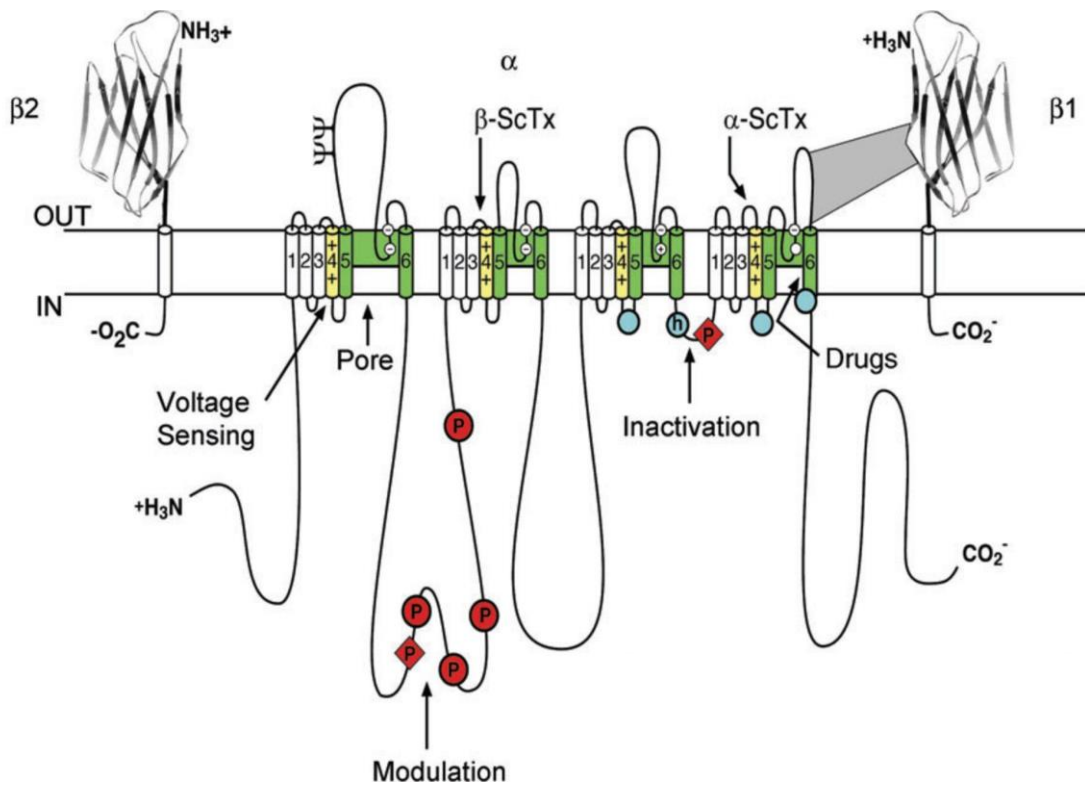


Figura 2. Estructura multimérica del Nav. La subunidad α formadora del poro está integrada por cuatro dominios homólogos, cada uno de los cuales está conformado por seis segmentos α -helicoidales. Los dominios I-IV están unidos entre sí por cadenas polipeptídicas intracelulares. Los segmentos S5 y S6 revisten el poro de selectividad, mientras que los segmentos S4 constituyen el sensor de voltaje. Por otro lado, las unidades β contienen un segmento α -helicoidal que atraviesa la membrana y una región β -plegada extracelular. Se señalan los sitios de unión de las toxinas α y β del escorpión en la subunidad α (Tomado de: Catterall, 2012).

Se tiene registro de 10 genes que codifican distintos subtipos de la subunidad α del canal de sodio en mamíferos. Éstos se expresan diferencialmente en los tejidos excitables: Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3 y Nav1.6 son los principales subtipos presentes en el sistema nervioso central; Nav1.7, Nav1.8 y Nav1.9 se encuentran principalmente en el sistema nervioso periférico; Nav1.4 se expresa predominantemente en el músculo esquelético; y Nav1.5 en el corazón; si bien a la mayoría de los subtipos se les puede encontrar expresados fuera de sus tejidos primarios. Nav1.10 es una proteína cuya función no depende del voltaje y está involucrada en la detección de la concentración de sodio. Cabe mencionar que, a causa de procesos de modificación transcripcional y de corte y empalme (*splicing* en inglés) selectivos, existe una gran variedad de isoformas de cada uno de los subtipos (Catterall, 2012).

2.1.3 Los canales de sodio tienen un papel en diversos trastornos neurológicos.

Los Navs no solo tienen un papel sobresaliente en la función electrofisiológica normal de las células excitables, sino que también están relacionados con una serie de padecimientos neurológicos como la epilepsia, el dolor neuropático, los tumores cerebrales, las lesiones cerebrales traumáticas y la esclerosis múltiple (Wang et al., 2017), y son blancos terapéuticos comprobados en la anestesia local, la analgesia general, la epilepsia y el desorden bipolar. Además, las investigaciones continúan caracterizando canalopatías en las cuales distintas mutaciones del canal de sodio están asociadas con parálisis periódica, miotonía, epilepsia y otros trastornos de carácter hereditario (Cusdin et al., 2008).

Dentro del sistema nervioso, los distintos subtipos del canal de sodio se expresan de manera diferencial en función de las características particulares de cada clase de neurona, lo que establece una variedad de escenarios dentro de los cuales pueden ocurrir trastornos neurológicos focalizados cuando los canales presentes sufren alteraciones. A este respecto, el grupo de investigadores liderado por John N. Wood (Eijkelkamp et al., 2012) y el grupo de Yun-Jie Wang y cols. (Wang et al., 2017) realizaron revisiones que recopilan los esfuerzos y hallazgos hechos en cuanto a la participación de los subtipos de Navs en diversos trastornos neurológicos cuando su expresión y/o función se ven modificadas. De dichas revisiones, se resume a continuación la información correspondiente a los canales presentes en el sistema nervioso. (Véase en la Tabla 1 la síntesis de este listado).

Nav1.1: El Nav1.1 se encuentra expresado preferentemente en neuronas inhibitorias GABAérgicas (Eijkelkamp et al., 2012) y su localización se circunscribe a los somas neuronales y la región dendrítica proximal y, en neuronas de la médula espinal, al segmento inicial del axón (Wang et al., 2017); se conoce bien que la mayoría de las mutaciones del gen *SCN1A*, que codifica al Nav1.1, ocasionan la pérdida de función del canal y causan el síndrome de Dravet

(una forma grave de epilepsia mioclónica de la infancia), aunque se han identificado otras mutaciones responsables de la epilepsia generalizada con convulsiones febriles plus y de la migraña hemipléjica tipo 3. Además, algunas mutaciones de novo del *SCN1A* se consideran candidatas en trastornos esporádicos del espectro autista (Eijkelkamp et al., 2012).

Nav1.2: Está expresado con abundancia en el SNC adulto, especialmente en la corteza y el hipocampo (Eijkelkamp et al., 2012), áreas en las que a nivel subcelular tiene una localización preferente en la porción proximal del segmento inicial del axón, en donde promueven la retro-propagación del potencial de acción hacia el soma (Wang et al., 2017). En humanos, las mutaciones del Nav1.2 se encuentran asociadas con la epilepsia hereditaria, principalmente aquella que se caracteriza por convulsiones neonatales benignas. También se ha determinado una intensa asociación de mutaciones de novo del *SCN2A* con el autismo (Eijkelkamp et al., 2012).

Nav1.3: Tiene extensa expresión en el cerebro humano, pero ésta es predominante en el soma neuronal y en la región proximal dendrítica, por lo que muy probablemente contribuye con la generación del potencial de acción. No se ha detectado una clara asociación de alguna mutación del Nav1.3 con enfermedades monogénicas (Eijkelkamp et al., 2012), pero su expresión se ha visto significativamente aumentada en neuronas de los ganglios de la raíz dorsal cuando tiene lugar una lesión del nervio, y en modelos animales esta regulación positiva de su expresión parece tener un papel importante en la patofisiología del dolor, principalmente el dolor neuropático resultante de la lesión por compresión crónica en la raíz dorsal, la cual se asocia con la descarga anormal persistente de potenciales de acción (Wang et al., 2017).

Nav1.6: Su expresión en el sistema nervioso es extensa y es notable en células de Purkinje, neuronas piramidales y granulares, y en motoneuronas, e incluso en células gliales y en células de Schwann. Se distribuye en gran concentración en los nodos de Ranvier, tanto en neuronas centrales como en axones sensoriales y motores del sistema nervioso periférico (Eijkelkamp et al., 2012); su expresión también es prominente en la porción distal del segmento inicial del axón y tiene un importante papel en la generación y propagación del potencial de acción. Por ello, se ha observado que la pérdida de actividad del Nav1.6 tiene como consecuencia una disminución de la excitabilidad neuronal. Por otra parte, estudios de secuenciación del exoma completo señalan que existe implicación de algunas mutaciones de novo del gen del Nav1.6 en la epilepsia (Veeramah, et al., 2012; O'Brien & Meisler, 2013; Gardella & Møller, 2019). En este sentido, cabe precisar que la secuenciación del exoma completo es un método de secuenciación que, con la finalidad de identificar “nuevas” variantes genéticas en un portador, se dirige a un subconjunto del genoma que abarca únicamente a los exones de genes codificantes de proteínas (Warr et al.,

2015, Veeramah, et al., 2013). Adicionalmente, estudios en modelos de lesión cerebral en ratas sugieren que el Nav1.6 podría estar involucrado la reacción secundaria a la lesión cerebral, ya que su expresión se ve significativamente incrementada en el curso de 72 horas posteriores a la lesión en neuronas hipocampales (Wang et al., 2017).

Nav1.7: Se le encuentra expresado en neuronas periféricas, principalmente neuronas sensoriales de la raíz dorsal que inervan la piel y las vísceras (Alexandrou et al., 2016) y en neuronas del ganglio trigeminal que inerva la región orofacial, así como en neuronas de la rama simpática y del epitelio olfativo (Eijkelkamp et al., 2012). Se ha encontrado un nivel de expresión marcadamente elevado del Nav1.7 en neuronas con fibras-C amielínicas (Wang et al., 2017). Las mutaciones del gen *SCN9A*, que codifica al Nav1.7 se hallan correlacionadas con distintos trastornos del dolor hereditarios: la eritromelalgia primaria hereditaria y el trastorno de dolor extremo paroxístico son originados por mutaciones dominantes que producen una ganancia de función del canal; mutaciones recesivas raras que entrañan la pérdida de función del Nav1.7 llevan a condiciones como la incapacidad de experimentar dolor y la anosmia (Eijkelkamp et al., 2012). Por otro lado, se detectaron variantes raras del Nav1.7 que aumentan de manera significativa el riesgo de desarrollar neuropatía dolorosa severa en presencia de un factor desencadenante como la diabetes (Sloan et al., 2018). Además, estudios en ratones muestran que la ausencia del Nav1.7 en neuronas sensoriales y simpáticas tiene como consecuencia una reducción dramática de la hipersensibilidad mecánica después de aplicar un modelo quirúrgico de dolor neuropático, señalando la importancia del Nav1.7 en el desarrollo del dolor neuropático y su potencial rol como blanco farmacológico (Eijkelkamp et al., 2012).

Dado que los canales de sodio son importantes para un gran número de trastornos neurológicos es importante estudiar las interacciones de los mismos con proteínas reguladoras de su función, como es el caso de las calpaínas.

Tabla 1. Patrones de expresión y efectos conocidos de algunas mutantes de subunidades α del canal de sodio dependiente de voltaje en humanos.

Canal	Expresión principal	Enfermedades asociadas con mutación del gen o alteraciones de la función del canal
Na _v 1.1	SNC, SNP	Epilepsia, migraña, autismo
Na _v 1.2	SNC, SNP	Epilepsia (asociada a la ganancia de función), autismo, ataxia episódica (asociada a la ganancia de función)
Na _v 1.3	SNC, SNP (elevada cuando ocurre una lesión del nervio)	Epilepsia (asociada a la ganancia de función)
Na _v 1.6	SNC, SNP, músculo liso	Retraso mental, atrofia pancerebelar, ataxia, encefalopatía infantil "experimental"
Na _v 1.7	SNP	"Pain free", eritromelalgia, trastorno de dolor extremo paroxístico (asociado a defectos en la inactivación rápida), anosmia, polineuropatía distal simétrica dolorosa de la diabetes.

Basado en Eijkelkamp et al., 2012.

2.2 Calpaínas.

2.2.1 Estructura, función y clasificación.

Las calpaínas conforman una familia de cisteína-proteasas cuya actividad está regulada por la concentración de calcio intracelular. La familia cuenta con 15 isoformas identificadas en humanos (CAPN1-CAPN16), las cuales en función de su perfil de expresión suelen clasificarse en dos grupos: calpaínas ubicuas y calpaínas tejido-específicas. Su actividad proteolítica es moduladora de la estructura y función de sus sustratos y se ha descrito su participación en procesos celulares como la remodelación del citoesqueleto, la división y diferenciación celular, el desarrollo embrionario, el tráfico vesicular, la transducción de señales, la apoptosis, e incluso la potenciación de largo plazo en el sistema nervioso central (Ma, 2013; Schoch et al., 2012; Waghray et al., 2004).

De acuerdo con su estructura, las isoformas de calpaína también se clasifican en calpaínas típicas o clásicas, y atípicas o no clásicas (Goll et al., 2003; Suzuki et al., 2004; Weber et al., 2019). Dentro de las calpaínas clásicas, algunas necesitan una subunidad auxiliar llamada calpaína 4 (o CAPNS1). Dado que estas calpaínas clásicas se estudiaron primero, actualmente se les denomina calpaínas *convencionales*, para distinguirlas de aquellas calpaínas descubiertas posteriormente, que no necesitan a la subunidad auxiliar y que se denominan calpaínas *no convencionales*. Tal como se esquematiza en la Figura 3, la estructura de las calpaínas clásicas consiste en cuatro dominios: el dominio I que incluye la región hélice N-terminal, el dominio II CysPc (del inglés *Cys-Protease core*), el dominio III CBSW (del inglés *calpain-type β sandwich*, antes conocido como C2L) (Ono et al., 2016) y el dominio IV que presenta cinco motivos de unión a calcio tipo EF (*Penta EF-Hand*); mientras que las calpaínas no clásicas en general carecen del dominio IV (Goll et al., 2003; Suzuki et al., 2004). Las calpaínas no clásicas que comparten características estructurales se agrupan en subfamilias, como la de homólogos de PaIB (CAPN5, CAPN6, CAPN7 y CAPN10) y la de homólogos de SOL (CAPN15) (Ono & Sorimachi, 2012). Cabe mencionar que *splicing* alternativos de genes de calpaínas tanto clásicas como no clásicas generan productos sin dominio II (Horikawa et al., 2000; Sorimachi et al., 1993).

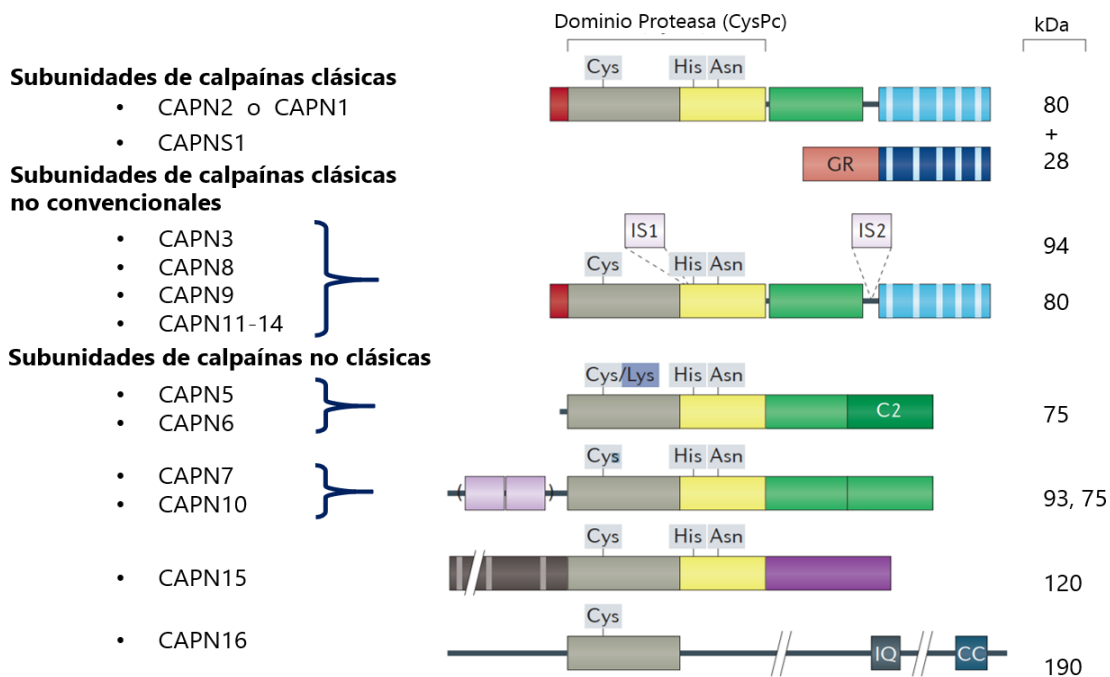


Figura 3. Estructura elemental de las isoformas de calpaína conocidas en humanos. Con excepción de la calpaína 15, todas poseen el dominio CysPc (gris-amarillo), en donde se señala la tríada catalítica Cisteína-Histidina-Asparagina; y el dominio CBSW (verde claro). La calpaína 16, ó demi-calpaína, presenta una estructura divergente. (Tomado de: Ono et al., 2016).

La calpaína 1 y la calpaína 2 exhiben la distribución más extensa en el organismo de vertebrados y se han establecido como isoformas prototípicas. Éstas tienen la peculiaridad de encontrarse en forma de heterodímeros compuestos por una subunidad catalítica grande de 80 kDa (dominios I-IV arriba descritos) capaz de autoproteolizarse cuando la enzima es activada por calcio, y por una pequeña subunidad reguladora de 30 kDa, conformada por un dominio rico en glicina y un dominio similar a calmodulina (*calmodulin-like*), denominados dominio V y dominio VI, respectivamente (Nixon, 2003). Cada isoforma responde a un umbral específico de calcio libre intracelular (calpaína 1 $\approx 1 \mu\text{mol/L}$; calpaína 2 $\approx 1 \text{mmol/L}$) para cambiar a la conformación catalíticamente activa gracias a la unión con calcio (Saatman et al., 2010). La concentración fisiológica de calcio va de 100-1,000 nM en condiciones estándar y puede alcanzar 5-10 μM en estados excitotóxicos. Así, la sensibilidad particular de las calpaínas 1 y 2 al calcio implica que la calpaína 1 puede ser afectada por cambios pronunciados en la concentración de calcio, y que posiblemente la activación de la calpaína 2 sea influida además por vías de señalización intracelular que involucran fosforilación por cinasas (Vosler et al., 2008).

Las calpaínas 1 y 2 son ubicuas por antonomasia, ya que se las ha detectado en la mayoría de los órganos humanos; si bien estas isoformas son especialmente abundantes en el sistema nervioso central (Liu et al., 2008).

2.2.2 Las calpaínas están involucradas en varias neuropatologías.

Numerosas evidencias indican que una variedad de trastornos neurodegenerativos crónicos como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Huntington (EH), la esclerosis múltiple (EM), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), o las afecciones agudas por isquemia cerebral, que ocasionan en última instancia eventos de muerte neuronal, involucran mecanismos patológicos que se basan, de manera convergente, en alteraciones de la homeostasis del calcio. Se ha probado que estos mecanismos de desregulación conducen a un incremento en el calcio intracelular que provoca la activación de calpaínas citosólicas y, consistentemente, en modelos de neurodegeneración (p.ej. apoptosis de células granulares por retiro de suero y potasio) y de daño isquémico, se ha demostrado que tanto la inhibición de la calpaína 1 como de la calpaína 2 por un inhibidor de alta afinidad por estas isoformas (PD150606) tiene un efecto neuroprotector (Rami et al., 2000; Verdaguer et al., 2005; Windelborn & Lipton, 2008). Por otro lado, la activación de esta u otras calpaínas también parece estar implicada en enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como la aparición de cataratas, la hipertensión, la artritis, la diabetes mellitus tipo 2, las distrofias musculares, la senescencia eritrocitaria (Nixon, 2003), y en los eventos neuropatológicos que acompañan a la lesión cerebral traumática (Saatman et al., 2010). Además, en la última década se han realizado

importantes esfuerzos de investigación que dan prueba de que la actividad incrementada de las calpaínas también está asociada con una variedad de patologías oculares como degeneración retinal, hipoxia retinal, desprendimiento de retina, retinitis pigmentosa y glaucoma (Schaefer et al. 2016).

Puesto que la distribución de las calpaínas es ubicua no es sorprendente que éstas tengan participación en la patogénesis de muchas enfermedades neurodegenerativas. La mayor parte de las investigaciones sobre la participación de las calpaínas en enfermedades neurodegenerativas se han centrado en el estudio de las calpaínas 1 y 2, y solo en algunos casos se ha explorado el papel de otras calpaínas, como ocurre con la calpaína 5. Sin embargo, cada tejido expresa más de una calpaína. Por ejemplo, en el sistema nervioso central es posible encontrar las isoformas 1, 2, 3, 5, 7 y 10 (Vosler et al., 2008) y, más aún, estimaciones de los niveles relativos de expresión de dichas calpaínas en el cerebro, por hibridación *in situ* (Schaefer et al., 2017) y PCR cuantitativa (Singh et al., 2014), indican que la calpaína 2 y la calpaína 5 son las isoformas con mayor expresión a nivel de mRNA en rata.

2.2.3 Calpaína 5. Participación en el desarrollo de retinopatías.

La calpaína 5 humana pertenece a la categoría de las calpaínas atípicas, es decir que el dominio IV se halla sustituido por una secuencia única denominada dominio T (Waghray et al., 2004). Dicho dominio recibe ese nombre por su homología con una calpaína descrita en *C. elegans*, denominada Tra3 (Huang & Wang, 2001; Mugita et al., 1997), la cual está involucrada en la muerte neuronal necrótica que subyace a la neurodegeneración cuando existe un incremento anormal en las concentraciones de calcio intracelular (Syntichaki et al., 2002). Cabe enfatizar que, como resultado del estudio más profundo del dominio IV de la calpaína 5, este dominio cambió su nombre de dominio T a dominio C2, ya que se encontró que se trata de una estructura cuya configuración posee características típicas de los dominios proteicos C2. Los dominios C2 son conocidos por su capacidad de unirse a fosfolípidos, misma que se muestra incrementada en presencia de calcio (Hosfield, et al., 1999). Esta particularidad de la calpaína 5 aumenta la posibilidad de que haya una interacción entre la calpaína 5 y proteínas membranales.

Estudios sobre la distribución de la calpaína 5 en el humano revelan que ésta se expresa en diversos tejidos (Waghray et al., 2004), y destacadamente en colon, riñón, hígado, tráquea, útero/testículos, ojo y cerebro (Schaefer et al., 2016). Entre las distintas calpaínas expresadas en el cerebro humano, el mRNA de la calpaína 5 es el segundo más abundante, un poco por debajo del nivel del mRNA de la calpaína 2 (Schaefer et al., 2017). El mRNA de la calpaína 5 tiene una distribución ubicua en el cerebro de ratas, mientras que en el cerebro humano está confinada al lóbulo frontal, el cerebelo, el hipotálamo, el tálamo, el puente y la médula (Schaefer et al., 2017).

Asimismo, se ha detectado expresión de calpaína 5 en todas las capas de la retina (Schaefer et al., 2016). Por otra parte, Singh y cols. (2014) reportan que calpaína 5 se expresa a nivel de proteína tanto en neuronas como en astrocitos y en oligodendrocitos del cerebro de ratas, y que su localización sería principalmente nuclear.

Hasta la fecha no se conoce por completo cuáles son las funciones fisiológicas de la calpaína 5 en el organismo humano. Sin embargo, se ha encontrado asociación de polimorfismos de calpaína 5 con la neurodegeneración retinal autoinmune, el síndrome de ovario poliquístico, la endometriosis, la diabetes y la enfermedad de Huntington (Singh et al., 2014). Algunas mutaciones puntuales en el gen de calpaína 5 son causantes de la vitreorretinopatía neovascular inflamatoria autosómica dominante (ADNIV por sus siglas en inglés), enfermedad caracterizada por una hiperactividad de la calpaína 5 que conduce a estados patológicos sucesivos que van de la uveítis, la retinitis y la neovascularización retinal hasta la retinopatía proliferativa y por último la ceguera (Mahajan et al., 2012).

3. Antecedentes.

3.1 Evidencias de la interacción de calpaínas y canales de sodio.

Las alteraciones en la estructura y la función de los canales de sodio dependientes de voltaje impactan profundamente la manera en la que se comportan las células excitables. Esto es manifiesto en el caso de la canalopatías genéticas, en las cuales la capacidad de señalización de las células es modificada por procesos patológicos complejos que pueden involucrar distintos grados de disfunción del canal, cambios en el nivel de expresión de sus distintas subunidades o cambios en su localización subcelular, los cuales se traducen ya sea en hipoexcitabilidad o en hiperexcitabilidad patológicas de la célula (Waxman, 2007).

Las alteraciones del canal como consecuencia de la proteólisis han sido estudiadas en el contexto de la lesión axónica por estiramiento y en la lesión isquémica. Estudios realizados por Von Reyn y colaboradores (2009; 2012) muestran que al inducir un aumento del ingreso de Ca^{2+} al citosol en modelos de lesión axónica mecánica y de lesión isquémica en neuronas corticales, tiene lugar la proteólisis de la subunidad α del Nav1.2, la cual produce al menos dos fragmentos de la proteína escindidos a la altura del asa I-II y el asa II-III. Aunque dichos fragmentos pueden observarse separadamente a través de ensayos de inmunodetección, éstos parecen conservar su sujeción a la membrana neuronal tras la degradación enzimática mediada por calpaína (Von Reyn et al., 2009). Consistentemente, en experimentos en los que se manipula la actividad de las calpaínas por inhibición tanto farmacológica (aplicando el inhibidor MDL28170) como

endógena (vía sobreexpresión de calpastatina) ya no es posible apreciar degradación del Nav1.2 en modelos de lesión cerebral (Schoch et al., 2013). Sin embargo, en dichos estudios no es posible distinguir la contribución de cada una de las diferentes calpaínas, porque la calpastatina y el MDL28170 inhiben por igual a todas las calpaínas presentes.

Acorde con lo anterior, Brocard y colaboradores (2016) han reportado que la proteólisis de canales de sodio dependientes de voltaje mediada por calpaína resulta en un incremento de las corrientes de sodio persistentes, tanto en un modelo de lesión medular en ratas neonatales como en células renales embrionarias humanas (HEK293). Más aún, los registros de “voltage-clamp” realizados en motoneuronas de segmentos lumbares revelaron que, en este modelo de lesión medular, el tratamiento crónico con MDL28170 reduce la amplitud y la densidad de las corrientes de sodio persistentes en comparación con lo que se observa en motoneuronas de ratas tratadas con vehículo. Adicionalmente, el tratamiento con el inhibidor de calpaínas MDL28170, administrado intraperitonealmente a las ratas lesionadas, redujo hasta en un 45% la intensidad de las bandas correspondientes a fragmentos de proteólisis de la subunidad α de canales de sodio en ensayos de *western blot* (Brocard et al., 2016).

Por otro lado, evidencias de nuestro laboratorio (Arratia-Cortés, 2014; Arratia-Cortés, et al., 2014) indican que los canales de sodio pueden interactuar con la calpaína 10 a través del dominio T. Y, de hecho, la calpaína 10 estructuralmente está más relacionada con la calpaína 5 que con las calpaínas 1 y 2. El estudio de la interacción entre la calpaína 10 y los canales de sodio es otra ramificación del estudio de las calpaínas y los canales de sodio en nuestro laboratorio, y está siendo investigada en un proyecto paralelo.

Asimismo, otro trabajo de nuestro laboratorio (Arratia-Cortés, 2018) sugiere que en el cerebro de ratas tratadas con estreptozotocina para la inducción de hiperglucemia, los subtipos Nav1.2 y Nav1.6 del canal de sodio podrían ser degradados por calpaínas, ya que el tratamiento con el inhibidor de calpaínas MDL28170 redujo la acumulación de productos de proteólisis de ambos subtipos de Navs en ensayos de *western blot*, comparados con ensayos en ratas hiperglucémicas no tratadas con MDL28170. Los resultados de Arratia-Cortés (2018) apuntan a calpaína 5 o calpaína 2 como posibles agentes de la degradación de los canales de sodio, ya que la expresión de mRNA de estas isoformas de calpaína se vio incrementada en el caso de las ratas hiperglucémicas respecto de las ratas control.

3.2. N1E-115 como modelo de estudio.

La línea N1E-115 es una sublínea adrenérgica derivada del neuroblastoma de ratón C 1300 (Jackson Laboratory, Maine), y fue obtenida y caracterizada en 1971 por T. Amano, E. Richelson y M. Nirenberg (Amano et al., 1972). En cultivo, las líneas derivadas del neuroblastoma C 1300

presentan características propias de las neuronas maduras, entre ellas la capacidad de generar potenciales de acción, la presencia de neuritas provistas de neurotúbulos y neurofilamentos, y la presencia de enzimas implicadas en la síntesis y el metabolismo de los neurotransmisores acetilcolina, dopamina y noradrenalina (Richelson, 1973). Amano y colaboradores (1972) han descrito que la sublínea N1E-115 expresa niveles altos de tirosina-hidroxilasa, la enzima que cataliza la síntesis de L-DOPA a partir de la L-tirosina, por lo que puede ser considerada una línea adrenérgica, similar a las neuronas de la rama simpática del sistema nervioso autónomo y las células de la médula suprarrenal.

Las células N1E-115 han sido utilizadas por varios investigadores para examinar a los canales de sodio dependientes de voltaje en aspectos que van desde sus propiedades biofísicas y farmacológicas hasta la regulación de su expresión, ya que esta línea celular expresa de manera nativa canales de sodio funcionales. Específicamente se ha reportado la presencia de mRNA de los subtipos Nav1.2, Nav1.3 y Nav1.7 (Benzinger et al., 1999; Hirsh & Quandt, 1996; Jo & Bean, 2011). Sin embargo, estos tres tipos de canales son indistinguibles desde el punto de vista electrofisiológico, por lo que la expresión a nivel de proteína de cada una de estas isoformas merece ser mejor caracterizada.

En nuestro laboratorio hemos valorado que este conjunto de características hace de la línea N1E-115 un modelo apto para el estudio de las probables interacciones de los canales de sodio dependientes de voltaje con las calpaínas y estudiar la proteólisis de los canales de sodio, pese a que no existen publicaciones respecto al perfil de expresión de calpaínas en esta línea celular. Cabe aclarar que varias de las calpaínas son de distribución ubicua y por lo tanto es muy posible que haya presencia de calpaínas de uno u otro tipo en las N1E115. Idealmente, nos hubiera gustado caracterizar la expresión de calpaínas en estas células, sin embargo, por cuestiones de tiempo no fue posible abordar este punto. Sin embargo, esperábamos que al sobreexpresar la calpaína 5 de forma heteróloga la actividad de la proteína exógena fuera mayor que la actividad basal de las calpaínas nativas.

En el futuro, esperamos que este modelo también sea de utilidad para investigar las implicaciones funcionales (p. ej. electrofisiológicas) de la interacción de la calpaína 5 o alguna otra isoforma de calpaína con los canales de sodio dependientes de voltaje.

4. Justificación.

La lista de condiciones patológicas donde se han observado cambios en la actividad de las calpaínas es bastante extensa. Sin embargo, elucidar el papel de estas proteasas en los procesos patológicos ha encarado notables dificultades; como por ejemplo, la gran cantidad de sustratos de proteólisis por calpaínas y la existencia de comunicación cruzada entre varios

sistemas proteolíticos. Otra situación que dificulta la investigación es la falta de inhibidores específicos, la cual ha limitado los progresos en la identificación de los sustratos que cada una de las isoformas de calpaína procesa de manera específica incluso en condiciones fisiológicas; (Bertipaglia & Carafoli, 2007). Como señalamos anteriormente, también los canales de sodio están implicados en múltiples patologías neurodegenerativas. Por ello, caracterizar las interacciones del canal de sodio ampliará nuestra comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen en el desarrollo de estas y otras patologías, y podría ayudar a extender el abanico de posibles blancos terapéuticos. En este sentido, el uso de modelos de expresión heteróloga para estudiar las interacciones entre calpaínas específicas (i. e., calpaína 5) y sus posibles blancos es de gran valor para entender mejor cómo las calpaínas influyen en la actividad de sus blancos.

5. Planteamiento del problema.

Con base en los antecedentes presentados, sabemos que la calpaína 5 es una de las isoformas con mayor abundancia relativa en el sistema nervioso y tiene mayor similitud con la calpaína 10 que otras calpaínas. Por esta razón, en este proyecto nos preguntamos si los canales de sodio pueden ser blancos de la calpaína 5. Para contestar esta pregunta, usamos la línea celular de neuroblastoma de ratón N1E-115, la cual expresa canales de sodio de forma nativa, y transfectamos dichas células con un plásmido que codifica a la calpaína 5 a fin de sobreexpresar esta isoforma como ocurre en el modelo de hiperglucemia, sin afectar el nivel de expresión de otras calpaínas.

6. Hipótesis.

H1. Si los canales de sodio son blancos de proteólisis de la calpaína 5, la sobreexpresión de la calpaína 5 podría inducir mayor proteólisis del canal de sodio.

H0. Si no hay interacción entre la calpaína 5 y el canal de sodio, es improbable que ocurra una mayor proteólisis del canal.

7. Objetivos.

Objetivo General

- Determinar si la expresión heteróloga de calpaína 5 en células N1E-115 de neuroblastoma de ratón produce la proteólisis del Nav.

Objetivos particulares

- Clonar el cDNA de calpaína 5 y expresar la proteína de manera heteróloga en cultivos de neuroblastoma N1E-115.
- Llevar a cabo ensayos de inmunodetección de distintas isoformas del canal de sodio (Nav1.2 y Nav1.7),
- Evaluar si hay patrones de proteólisis de Nav1.2 y Nav1.7, producidos como consecuencia de la expresión y la activación de calpaína 5 en el neuroblastoma N1E-115.

8. Materiales y métodos.

8.1 Cultivo de células de neuroblastoma N1E-115.

Nuestro laboratorio cuenta con un cultivo madre de células N1E-115 el cual es, a su vez, un subcultivo de un vial adquirido directamente de la *American Type Culture Collection* (ATCC® CRL-2263™). Las células se cultivaron en medio completo, es decir, medio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM), suplementado con, L-glutamina 2 mM (Invitrogen), 10% suero fetal bovino (ATCC), y antibiótico/antimicótico (Sigma-Aldrich: penicilina 100,000 u/L, estreptomicina 100 mg/L y anfotericina 250 µg/L). El cultivo se mantuvo a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂, y el medio se reemplazó con medio fresco cada tercer día. Para mantener el cultivo madre las células se sembraron una vez por semana (pasaje), a razón de 5,000 células/cm², y se usaron dentro de los pasajes 3 al 20. Los cultivos experimentales se mantuvieron en las mismas condiciones de medio e incubación, pero se cultivaron en cajas multipozo a una densidad de 22,000 células/cm² y se mantuvieron en 3 mL de medio completo.

8.2 Clonación de calpaína 5.

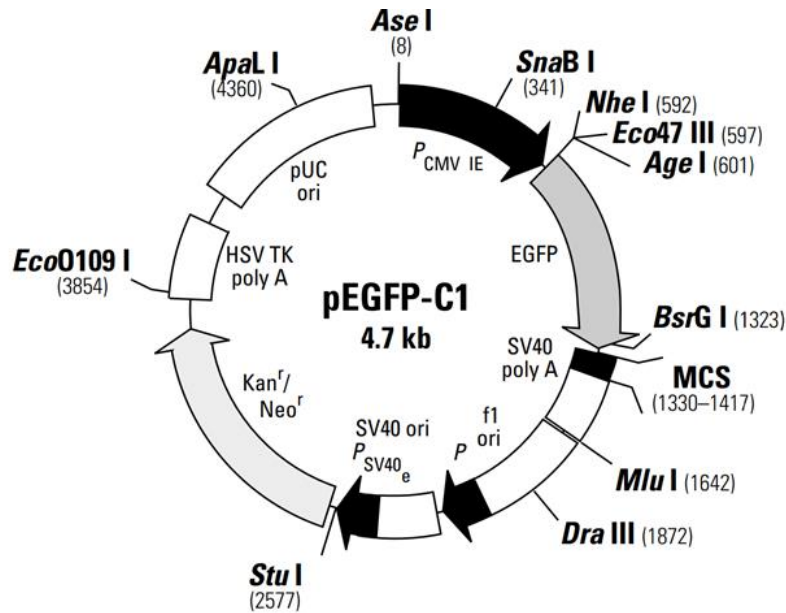
8.2.1 Diseño de oligonucleótidos (*primers*).

La secuencia de DNA codificante de calpaína 5 de *Rattus norvegicus* fue obtenida del banco de información genómica del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), con el número de acceso NM_134461.2. A partir de dicha secuencia se hizo el diseño de “primers” (Tabla 2)

para clonar el cDNA de calpaína 5 en el marco de lectura de la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente EGFP, contenida en el vector de clonación pEGFP-C1 (número de acceso NCBI: U55763), ubicada en la posición 606-1410 del plásmido pEGFP-C1 (Figura 4).

Tabla 2. Diseño de oligonucleótidos (*primers*) para amplificación de Capn5.

Secuencia de cDNA	ID del NCBI	Primer	Secuencia 5'-3'	Enzima de restricción	Sitio de clonación en el pEGFP	Longitud del amplicón (pb)	Tm (°C)	% GC
Capn5	NM_134461.2	For	GACGAAGCTT CCATGTTCTC CTGCACAAAG GCC	<i>Hind III</i>	1,352	1,923	72.04	54.55
		Rev	TGGCCGCGGA CAGCCGTGAG AGAGGCACTG	<i>Sac II</i>	1,379	1,923	77.59	70.00



NCBI #U55763

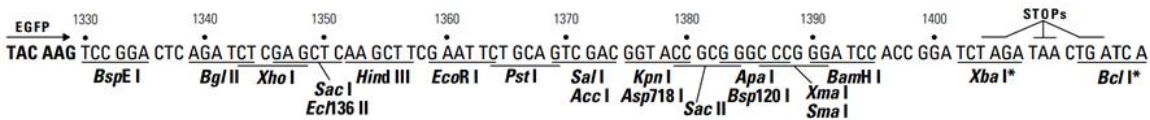


Figura 4. Mapa del plásmido utilizado para clonar la calpaína 5. El pEGFP-C1 es un vector que ha sido optimizado para inducir altos niveles de expresión de proteínas recombinantes en células de mamíferos. Se indica en números la posición de varias secuencias destacadas, incluida la región que codifica la EGFP, una proteína fluorescente que al expresarse en fusión con la calpaína 5 nos sirve como reportera. Abajo se esquematiza el sitio de clonación múltiple y los sitios de reconocimiento de diversas restrictasas (MCS).

Tomando como base el mapa de restricción de la secuencia de la calpaína 5 y el sitio de clonación múltiple del vector, se seleccionaron dos sitios de restricción de endonucleasas para ser añadidos a los oligonucleótidos, para crear extremos cohesivos. Con el fin de promover la unión unidireccional del inserto de calpaína 5 al vector, se eligieron los sitios de restricción de las enzimas *Hind III* y *Sac II* que producen un único corte en la secuencia de multiclonación del pEGFP-C1, pero ningún corte en la secuencia codificante de calpaína 5. Adicionalmente, se seleccionó la enzima *EcoR I* como auxiliar para identificar aquellos clones con el plásmido recombinante EGFP-Capn5. El patrón de restricción esperado con esta enzima consiste de dos bandas de 5,842 bp y 804 bp.

De este modo diseñado el par de oligonucleótidos específicos para la amplificación de calpaína 5, se procedió a evaluar sus características, su especificidad, el grado de complementariedad entre miembros del mismo par, y sus probables productos, mediante las herramientas virtuales Primer Blast del NCBI y OligoAnalyzer 3.1 de Integrated DNA Technologies.

8.2.2 PCR y producción de la construcción pEGFP-Capn5.

Como paso previo a la amplificación por PCR del cDNA de la calpaína 5, se utilizó TRIzol™ para extraer la totalidad del RNA del cerebro de cuatro ratas *Wistar* adultas. El RNA aislado se utilizó como molde para sintetizar el cDNA por transcripción inversa. La retrotranscripción se realizó en un termociclador programable T100 Thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Incorporated) y constó de tres etapas, de acuerdo con las instrucciones del fabricante de la retrotranscriptasa M-MLV RT (Ambion AM2044): 1) En la primera etapa, se agregaron se agregaron en un tubo de reacción 5 µg de RNA, 0.5 µg de oligo dTs y agua libre de nucleasas en un tubo de PCR, se mezclaron en un "vortex" y se incubaron a 75° C por 5 min. Posteriormente, la mezcla se colocó en hielo brevemente y se añadió 1 µL de retrotranscriptasa (100 u/µL), la solución amortiguadora (o *buffer*, en inglés) de la enzima y los dNTPs (2.5 mM de cada uno), completando un total de 20 µL de mezcla de reacción. 2) Durante la segunda etapa la reacción se incubó 1 h a 43 °C. Por último, 3) la tercera etapa se llevó a cabo elevando la temperatura a 92°C durante 10 min con el objetivo de inactivar a la enzima M-MLV RT. El producto de retrotranscripción se almacenó a -20°C para su uso posterior.

Para amplificar el cDNA de calpaína 5 el protocolo de la PCR consistió en tres etapas: 1) una desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, 2) Seguida de 39 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, hibridación de oligonucleótidos a 63 °C por 30 s, y elongación a 72 °C por 2 min 15 s, y 3) finalmente la reacción se incubó a 72°C por 5 min para promover la elongación final de los productos de PCR. Tanto las reacciones positivas (con cDNA molde) como las reacciones control (sin cDNA) incluyeron 0.3 µL de enzima polimerasa DreamTaq DNA Polymerase (5 u/µL, Thermo Scientific), el *buffer* de la enzima, dNTPs 10 mM, MgCl₂ 25 mM, y 1µL de oligonucleótidos (5µM cada uno), y se realizaron por duplicado. Los productos de PCR se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa 0.8% en *buffer* TAE 1x (40 mM TRIS-ácido acético/1 mM EDTA). Las bandas se visualizaron por medio de tinción con bromuro de etidio (1 µg/mL). La imagen del gel se obtuvo exponiendo a luz UV (360 nm) el gel teñido en un fotodocumentador Bio-Rad Gel Doc EZ.

El cDNA de calpaína 5 y el plásmido pEGFP se sometieron a digestión doble en reacciones sucesivas con las endonucleasas *Hind III* (Invitrogen) y *Sac II* (NEB Incorporated). Conforme con los instructivos de las enzimas, cada una de las digestiones se llevó a cabo en el *buffer*

proporcionado por el fabricante, durante 12 h a 37°C. Las reacciones fueron detenidas una vez que los tubos se llevaron a refrigeración a -20 °C.

Antes de proceder a la ligación de las moléculas de DNA recombinante, se tomaron algunas medidas para hacer más eficiente el proceso de ligación: 1) Se desfosforiló el plásmido pEGFP linealizado (i. e., doble digerido) con fosfatasa alcalina de intestino de becerro (CIAP, Invitrogen), para evitar su recircularización; y 2) Se efectuó la purificación por gel del cDNA de la calpaína y el pEGFP previamente digeridos con *Hind III* y *Sac II*. Para hacer dicha purificación, el DNA se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para separar los fragmentos digeridos, y se procedió al corte de las bandas de tamaño esperado. Se solubilizó el gel y el DNA en un *buffer* de lisis y se recuperó del DNA por unión a columnas de sílice con el kit Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research). Los productos purificados se verificaron nuevamente mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, y el mismo gel se utilizó para hacer una estimación por densitometría de la proporción molar de las moléculas con base en la intensidad de las bandas observadas, a través del programa de procesamiento de imágenes digitales ImageJ (Schneider, et al., 2012).

Una vez purificados, se utilizó la ligasa T4 DNA Ligase (Thermo Scientific) para unir de manera estable el inserto de calpaína 5 con el pEGFP linealizado a través de los extremos cohesivos. Según lo recomendado por el fabricante, a cada mezcla de reacción se añadió el *buffer* propio de la enzima, 2.5 mM ATP, y el inserto y el vector en una relación molar de 3:1, y se les incubó a 22 °C durante 1 h. La efectividad de la ligación se comprobó al correr los productos mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% con *buffer* TAE 1x.

8.2.3 Transformación de células competentes y selección de transformantes.

Con la finalidad de amplificar el constructo pEGFP-Capn5 se llevó a cabo el procedimiento para transformar un vial de 50 µL de células competentes de *Escherichia coli* DH5α (*One Shot® MAX Efficiency®* DH5α™-T1R *Competent Cells*, Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. El plásmido recombinante se introdujo mediante choque térmico a 42 °C por 45 seg en las células DH5α; éstas se llevaron a recuperación en medio SOC a 37 °C y se mantuvieron en agitación por 1 h. Posteriormente se sembraron 100 µL de bacterias en placas de medio LB-agar suplementado con kanamicina (30 µg/mL) y las placas se incubaron a 37 °C por 16 h para fomentar el crecimiento de colonias a partir de las células eficientemente transformadas. Se seleccionaron 5 colonias para extraer el plásmido para su análisis por restricción. Los clones se subcultivaron en medio LB líquido suplementado con kanamicina y se incubaron a 37° C en agitación constante durante 12 h. Para purificar el DNA plasmídico se usó el kit ZR Plasmid Miniprep (Zymo Research). Brevemente, se compactaron las células por centrifugación y se

lisaron con un *buffer* alcalino. El lisado se centrifugó nuevamente para eliminar el material insoluble y el DNA plasmídico disuelto en el *buffer* se unió a una columna de sílica. El DNA unido se lavó con un *buffer* proporcionado por el fabricante y se desprendió de la columna con 50 μ L de agua libre de DNAsas.

Los plásmidos obtenidos se sometieron a un análisis de restricción con *EcoR I* (Invitrogen), con la finalidad de identificar los clones que retuvieron el constructo pEGFP-Capn5 íntegro. La digestión se llevó a cabo a 37°C durante 2 h. Al final de la reacción, el plásmido digerido se separó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para buscar el patrón de restricción esperado de dos fragmentos de 5,842 pb y 804 pb.

A partir de este análisis, encontramos dos clones con el patrón de restricción esperado, el cual se verificó mediante secuenciación Sanger, para lo que se usaron los servicios del Instituto de Biotecnología-UNAM. Los oligonucleótidos diseñados y empleados para la secuenciación flanquean el sitio de clonación múltiple. Para secuenciar ambas hebras usamos un *primer forward* = 5' GACCGCCGCCGGATCACTCTC, y un *primer reverse* = 5' AACCTCTACAAATGTGGTATG. El cromatograma resultante de la secuenciación lo analizamos con el software 4Peaks v.1.8 (Nucleobytes B. V.) para rectificar manualmente aquellos nucleótidos no resueltos por el secuenciador. De este modo obtuvimos las secuencias de nucleótidos definitivas del inserto y de una parte del C-terminal de la EGFP. Finalmente, comparamos nuestra lectura de la secuenciación de calpaína 5 con las secuencias publicadas en la base de datos del NCBI.

8.3 Transfección de células N1-E115 con pEGFP-Capn5 y pEGFP.

El procedimiento de la transfección se basó en el método publicado por Longo y colaboradores (Longo et al., 2012). Para realizar los experimentos de transfección se utilizó PEI MAX-Clorhidrato de polietilenimina lineal grado transfección MW 40,000 (Polysciences, Incorporated). La solución de trabajo se preparó diluyendo 1 mg de clorhidrato de polietilenimina en 1 mL de agua destilada y ajustando la solución a pH 7 con HCl.

Las células N1E-115 se sembraron en cajas multipozo 24 h antes de la transfección, e inmediatamente antes de someterlas al procedimiento de transfección se les renovó el medio de cultivo. Derivado de estudios previos del laboratorio, se usó una proporción 1:4 de μ g DNA: μ g PEI y 0.43 pmoles de plásmido, ya que usando 2 μ g de pEGFP-C1 (0.43 pmoles) y 4 μ g de PEI se obtuvo ~80% de células transfectadas. La solución de transfección se preparó en dos partes: 1) En un tubo A se preparó la solución de DNA plasmídico añadiendo 2 μ g de DNA en 150 μ L de DMEM sin suplementar; 2) en un tubo B se agregaron 8 μ g de PEI en 150 μ L de DMEM sin suplementar. El contenido de cada tubo se mezcló durante un minuto en un "vortex" y a

continuación se transfirió la solución de PEI desde el tubo B al tubo A. Para homogeneizar se pipeteó suavemente la mezcla y después se incubó el tubo a temperatura ambiente para permitir la formación de complejos PEI/DNA durante 30 min. Al finalizar la incubación se vertió muy lentamente el volumen completo de este complejo de transfección en el pozo con células N1E-115 y se movió un poco la placa de lado a lado para facilitar la distribución de la solución por todo el pozo. Finalmente, las células transfectadas se devolvieron a la incubadora a 37°C, donde se mantuvieron en el mismo medio de cultivo durante 48 h. Al cabo de estas 48 h, se tomaron fotos de al menos 3 campos de cada condición para evaluar la eficiencia de la transfección. En lo sucesivo, se usó la misma proporción de DNA:PEI para la transfección con pEGFP-Capn5. Adicionalmente, en algunos experimentos los neuroblastomas fueron co-transfectados con los plásmidos pEGFP-Nav1.2CT-FLAG y pEGFP-Nav1.6CT-FLAG. Para ello se utilizó también DNA:PEI en proporción 1:4.

8.4 Obtención de proteína total y western blot.

Las células se lavaron con PBS para retirar el medio de cultivo y se lisaron directamente en *buffer* RIPA (140 mM NaCl, 10 mM TRIS-Cl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0.1 % desoxicolato de sodio, 0.01 % SDS) adicionado con inhibidores de fosfatasas (20 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄) y un *cocktail* de inhibidores de proteasas (*Protease Inhibitor Cocktail*, Sigma-Aldrich) que contiene: AEBSF, Aprotinina, Hidrocloruro de Bestatina, E-64, EDTA y Hemisulfato de Leupeptina. Adicionalmente se agregó 1 mM PMSF (Sigma-Aldrich). Los lisados celulares se sonicaron incubando los tubos en hielo y aplicando dos pulsos de 50 W directamente a la suspensión de células. Se midió la concentración de proteínas por el método de Bradford, comparando contra una curva estándar de albúmina bovina. Se prepararon soluciones de trabajo a 1 mg/1mL en RSB (125 mM TRIS-Cl pH 6.8, 4% SDS, 20% v/v glicerol, 0.02% azul de bromofenol, 10% 2-mercaptoetanol). Se utilizaron 20 µg cada muestra para separar las proteínas por SDS-PAGE. Se usaron geles de acrilamida a diferentes concentraciones y se realizó la electroforesis a 20 mA durante una hora en *buffer* TRIS-Glicina (25 mM TRIS, 192 mM glicina, 0.1% SDS). Una vez separadas, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF de 0.2 µm. Las membranas se expusieron a anticuerpos monoclonales específicos para Nav1.2, y Nav1.7 obtenidos de NeuroMab (Universidad de California). Adicionalmente se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-GFP y anti-Flag para detectar la proteína de fusión EGFP-Capn5 y los carboxilos terminales de Nav1.2 y Nav1.6, respectivamente (véase información más detallada de los anticuerpos en la Tabla 3).

Finalmente, se hizo un análisis semicuantitativo de los *blots* mediante densitometría. La intensidad de las señales se determinó utilizando el software de análisis de imágenes ImageJ

(Schneider, et al., 2012). Se midió la densidad integrada de cada una de las bandas y a este valor se restó la densidad medida para el fondo del correspondiente carril en un área de idéntico tamaño al de la banda, con lo cual obtuvimos el valor de densidad neta de cada banda detectada con el anticuerpo anti-Nav1.7. En la Figura 12C observamos la comparación gráfica de los promedios de densidad neta de las muestras transfectadas con EGFP ($n=2$) y las muestras transfectadas con EGFP-Capn5 ($n=2$). Por otra parte, en la Figura 12B se muestra un gel de electroforesis que señala que se cargó la misma cantidad de proteína en cada uno de los carriles del gel y que, en efecto la intensidad de las bandas teñidas con azul de Coomassie es la misma en ambos carriles.

8.5 Tratamiento estadístico de los datos.

En los análisis de supervivencia y de eficiencia de la transfección en las células N1E-115, tanto los conteos de células totales como los de células que presentan fluorescencia, se expresan como media \pm SD. Para establecer las diferencias entre las medias se utilizó la prueba *t-Student*. La n utilizada en cada experimento se indica en las figuras correspondientes. Para el cálculo del peso molecular de las bandas se realizó una regresión exponencial, de la cual se obtuvo la ecuación $y=0.0176e^{-0.0176x}$, el ajuste tuvo una $R=0.994$.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para inmunodetección de proteínas por *western blot*.

Antígeno	No. catálogo	Marca	Localización del epítipo	Origen
GFP	sc-81045	Santa Cruz Biotechnology	---	Ratón
Nav 1.2 (r, m, y h)	K69/3	Neuromab Facility, University of California	1882-2005 (C-terminal)	Ratón
Nav 1.7 (r, m y h)	N68/6	Neuromab Facility, University of California	1751-1946 (C-terminal)	Ratón
FLAG-tag	sc-166355	Santa Cruz Biotechnology	OctA (FLAG®)-tag	Ratón

Abreviaturas: r=*Rattus norvegicus*, m=*Mus musculus* y h=*Homo sapiens*.

9. Resultados.

9.1 Diseño del constructo, clonación y análisis del plásmido pEGFP- Capn5.

El primer paso en nuestro proyecto fue la clonación de la calpaína 5 en un vector capaz de dirigir la expresión de la proteína en células de mamífero. Para esto se seleccionó el plásmido pEGFP-C1. Dicho plásmido posee un sitio de multi-clonación en el extremo carboxilo de la proteína verde fluorescente, por lo que se puede producir una proteína de fusión, fácilmente rastreada en un microscopio de fluorescencia. Como se describió en los métodos, se prefirió la fusión del inserto al extremo carboxilo (y no al extremo amino) de la EGFP debido a que consideramos más probable que la calpaína 5 interactúe con los canales de sodio a través de su dominio IV (dominio T). Fusionando la EGFP con el N-terminal de la calpaína 5, el dominio T de ésta se mantiene libre para interactuar, y prevenimos que alguna interacción estérica interfiera con la unión del dominio T y los canales de sodio. La simulación *in silico* del constructo y el respectivo mapa de restricción se muestra en la Figura 5. Dicho análisis nos permitió validar el diseño y cotejar la coherencia de los marcos de lectura en toda la longitud del plásmido, prediciendo la expresión de una proteína de fusión EGFP-Capn5 de ~100.86 kDa.

Aunque el análisis de *primers* con el programa BLAST sólo predecía la amplificación de un único amplicón de 1,922 pb, también se amplificó una banda de 500 pb cuyo origen pudiera ser espurio o bien podría originarse de alguna variante de *splicing* no reportada (Figura 6A). Tras la digestión del amplicón de calpaína 5 con las enzimas *Hind III* y *Sac II* y la separación por electroforesis, se recuperó el cDNA de la banda de ~2,000 pb (Figura 6B), y con esto se eliminó la banda de 500 pb. Puesto que las bandas de calpaína 5 y del pEGFP linealizado exhibieron el tamaño esperado, en este punto se procedió a su ligación enzimática con la ligasa T4. La efectividad de la ligación se confirmó a través de electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, en el cual fue posible visualizar un barrido que se extiende por la parte superior del carril, muy por encima de la posición que toma el plásmido cuando está linealizado, e incluso por arriba del nivel del marcador de más alto peso molecular (Figura 6C).

El producto de la ligación fue introducido en células competentes de la cepa *E. coli* DH5 α para su amplificación. Se seleccionaron 5 colonias, de las cuales se realizó la extracción de los plásmidos y un análisis de restricción con *EcoR I*, con la finalidad de identificar los clones que retuvieron el constructo pEGFP-Capn5. En la Figura 7A, se muestra el análisis de dichos clones, en los carriles 2 y 8 se observan dos clones con el patrón de restricción esperado (5,842 pb y 804 pb).

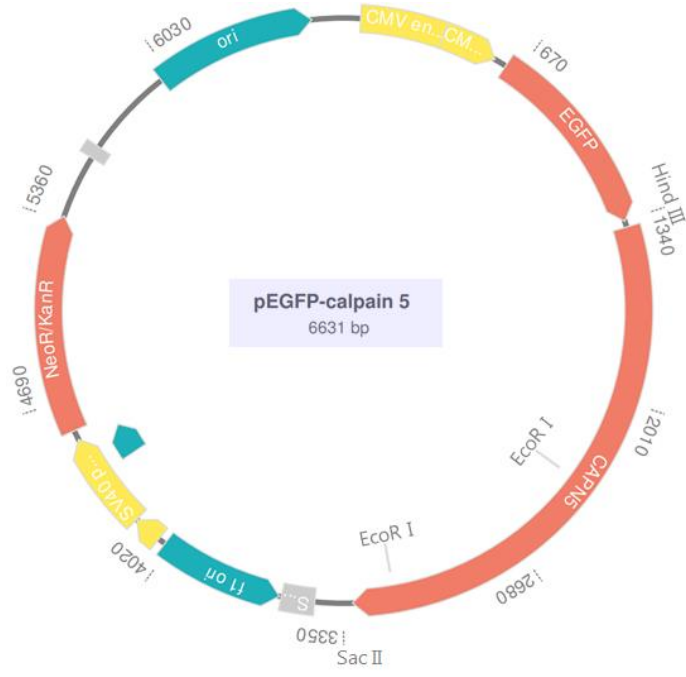


Figura 5. Mapa del constructo pEGFP- Capn5. Por medio de esta simulación *in silico* se examinó el constructo diseñado y se verificó la congruencia de los marcos abiertos de lectura de la EGFP y la calpaína 5. En el mapa se señalan los sitios de reconocimiento de las enzimas *Hind III* y *Sac II*, las cuales empleamos para ensamblar el vector con el inserto de calpaína 5. Como se ilustra en el esquema, *EcoR I* produce dos cortes a lo largo del plásmido y genera fragmentos de 5,842 bp y 804 bp.

Como se mencionó anteriormente, la secuenciación se hizo con apoyo del Instituto de Biotecnología (UNAM). Al comparar nuestra lectura de la secuenciación de calpaína 5 con las secuencias publicadas en el NCBI, se comprobó que el marco de lectura de la construcción EGFP-Capn5 era adecuado (Figura 7B), y que la secuencia de cDNA de calpaína 5 es idéntica a la secuencia publicada.

9.2 Eficiencia de la transfección con plásmidos recombinantes.

Antes de analizar el efecto de la calpaína 5 sobre los canales de sodio se tomaron fotografías de la fluorescencia en verde y en transiluminación y se cuantificó la proporción de células transfectadas. Las fotografías fueron tomadas 48 horas después de realizarse la transfección y justo antes de la recuperación de las proteínas. Las células transfectadas con pEGFP mostraron una coloración verde fluorescente uniforme y brillante, presente tanto en el soma como en los

procesos celulares (Figura 8A, panel superior). En las células que expresan EGFP-Capn5 observamos fluorescencia verde aparentemente atenuada, bien distribuida por todo el soma y los procesos (Figura 8A, panel inferior).

Al analizar las fotografías se confirmó que en las transfecciones con 0.43 pmol (2 µg) de pEGFP-C1 la transfección alcanzó un $80.01 \pm 0.1\%$. Sin embargo, al usar la misma proporción de PEI:DNA y la misma cantidad de picomoles del plásmido pEGFP-Capn5, la eficiencia de la transfección se redujo un 47%, ya que en las células transfectadas con pEGFP-Capn5 la eficiencia de transfección alcanzó tan solo el $33.20\% \pm 0.01\%$ (Figura 8B). En el panel A de la Figura 8 se muestran dos microfotografías representativas de tres experimentos de transfección de las N1E-115 con los plásmidos pEGFP y pEGFP-Capn5.

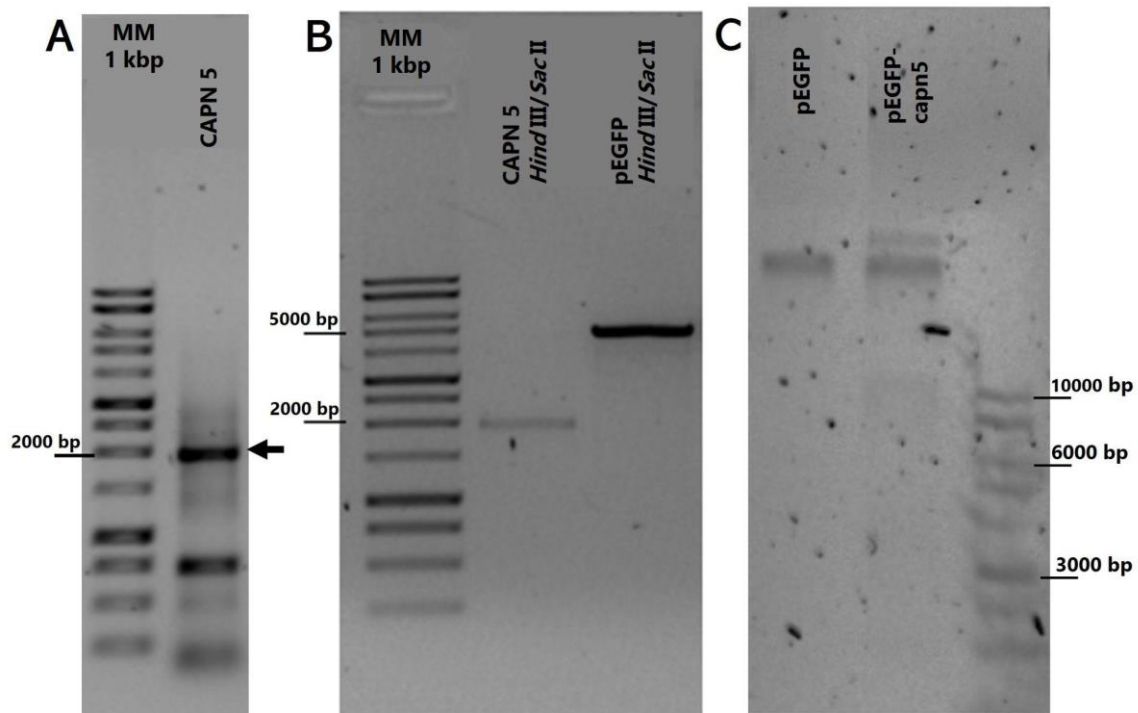


Figura 6. Amplificación del cDNA calpaína 5, digestiones del inserto y del vector, y ligación de los mismos. **A.** Verificación del amplicón de calpaína 5. En el segundo carril se muestra el producto de la PCR; se observa una banda densa que corresponde al tamaño esperado para la calpaína 5, de cerca de 1922 bp. **B.** Productos de la digestión doble con *Hind III/Sac II*. Las bandas tienen la ubicación esperada: calpaína 5 de 1922 bp y el pEGFP-C1 de 4,700 bp. **C.** Ligación del inserto de calpaína 5 y el vector pEGFP en proporción 3:1 (Capn5:pEGFP 3:1) y pEGFP no digerido como control. Cada gel contiene una escalera de DNA de 1 Kb (MM), se anotó el peso de algunas de las bandas como referencia.

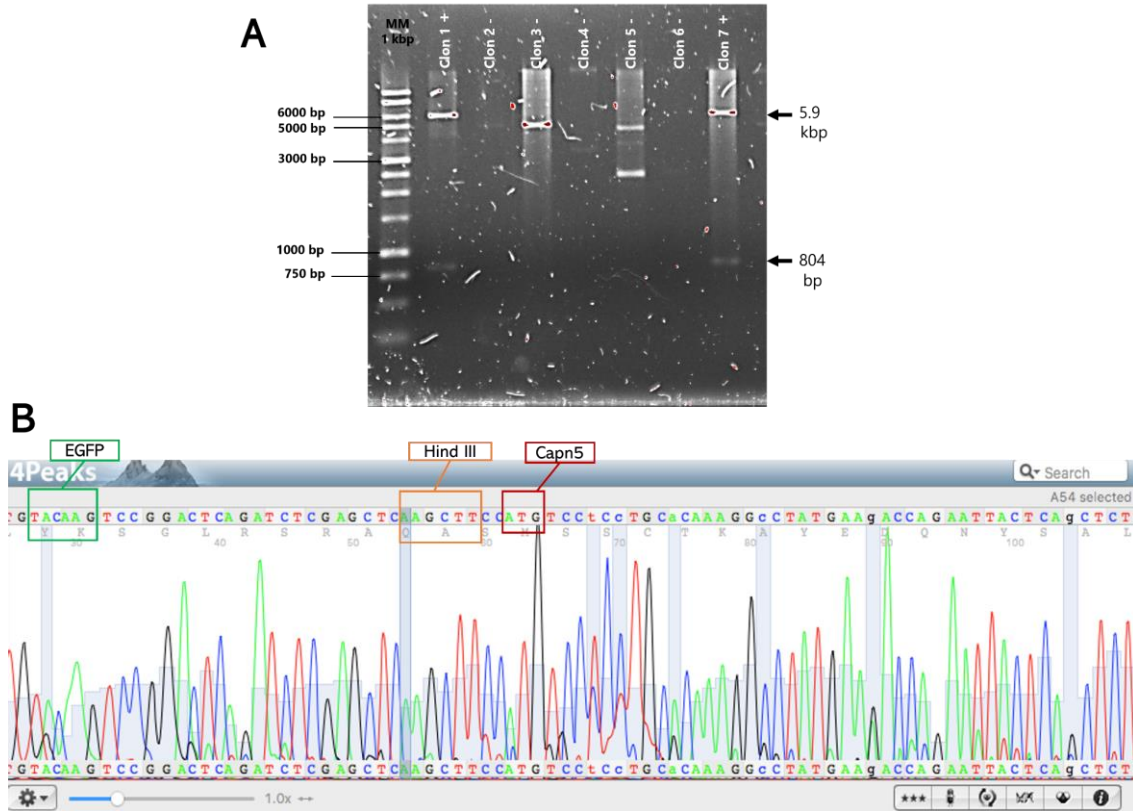


Figura 7. Análisis de transformantes de pEGFP-Capn5 y secuenciación del plásmido. A. El análisis se efectuó utilizando la endonucleasa *EcoR I*. En la fotografía se aprecia que tanto el clon 1 como el clon 7 poseen el constructo adecuado, pues las bandas generadas tras la electroforesis obedecen el patrón que esperábamos: 5,842 bp y 804 bp. **B.** Recorte del cromatograma obtenido a partir de la secuenciación Sanger, y a través de cuyo análisis se corroboró la secuencia de la fusión EGFP-Capn5. Recuadro verde: se muestran los últimos 2 codones del C-terminal de la EGFP (TAC-AAG), seguidos del sitio de multiclonación; Recuadro naranja: muestra la secuencia de reconocimiento de la enzima *Hind III*, la cual se utilizó para insertar el extremo 5' de calpaína 5; Recuadro rojo: En la posición 62-64 se ubica el codón de la primera metionina de la calpaína 5, lo cual nos indica que toda la secuencia se encuentra en el mismo marco de lectura. La traducción de la secuencia de nucleótidos aparece debajo de cada codón en gris, confirmando que el marco de lectura es continuo.

Para estudiar la posibilidad de que la expresión de la calpaína 5 tuviera efectos tóxicos en las células, se examinó la supervivencia de las células a las 48 h posteriores a la transfección. El análisis indica que las células conservaron la misma tasa de proliferación de los neuroblastomas transfectados con pEGFP. En promedio se observaron 529 ± 200.80 (Media \pm SD) células por campo, mientras que en los cultivos tratados con pEGFP-Capn5 observamos una media de 621 ± 144.5 células por campo (Figura 8B). De acuerdo con la prueba t de Student, estos promedios

no difieren significativamente entre sí ($p=0.625$), por lo que podemos concluir que efectivamente la expresión con el plásmido pEGFP-Capn5 fue menos eficiente.

9.3 Expresión de proteínas heterólogas EGFP y EGFP-Capn5.

La integridad de las proteínas de EGFP y EGFP-Capn5 se verificó por *western blot* usando un anticuerpo anti-GFP. La Figura 9A muestra un *blot* representativo de una serie de 3 ensayos. Se observa que en las células transfectadas hubo una adecuada expresión de las proteínas heterólogas, tanto de la proteína de fusión EGFP-Capn5 (~100.86 kDa) como de la EGFP individual (~28 kDa). Además, en ambos casos se detectaron productos de proteólisis putativos. No obstante, aún es necesario verificar que dichos fragmentos están ausentes en las células N1E-115 sin transfectar, lo cual nos indicaría que el anticuerpo se une de manera específica a la EGFP y a los productos de proteólisis observados en nuestros experimentos.

Es notable que en las células transfectadas con pEGFP el anticuerpo contra GFP reconoció dos bandas, una banda de ~28 kDa, que se presume que corresponde a la EGFP de tamaño completo y otra banda de ~23 kDa que, de acuerdo con el análisis in silico que se presenta en la Figura 9C, podría ser producto de la proteólisis de EGFP por las calpaínas endógenas o heterólogas. Aunque no hay una secuencia consenso que identifique los sitios de corte de las calpaínas, algunos grupos han tratado de hacer programas que predicen los sitios de corte por comparación con proteínas blanco de calpaínas, cuyos sitios de corte están plenamente identificados (p. ej. Verspurten et al., 2009; duVerle et al., 2010). Utilizando el programa GPS-CCD 1.0, disponible en línea (<http://ccd.biocuckoo.org/down.php>), y diseñado por Liu y colaboradores (2011), ocurrió que el programa predice un sitio de corte en el extremo carboxilo de la secuencia del EGFP, que no parece afectar la fluorescencia de la proteína, pero podría liberar el fragmento de 23 kDa observado en las células transfectadas con la quimera EGFP (Figura 9B y C). De forma similar, en las células transfectadas con pEGFP-Capn5, se advierte la presencia de varias bandas. Al igual que en las células transfectadas con pEGFP, se encontraron 2 bandas de 23 y 28 kDa, así como bandas de alto peso molecular que corresponden a lo esperado para la quimera EGFP-Capn5, 100.86 kDa. De hecho, de acuerdo con un estudio reciente de Bondada y colaboradores (2021), la activación de la calpaína 5 conlleva la escisión de 13 KDa del extremo carboxilo. En buen acuerdo con esta observación, cuando se analizaron las bandas de alto peso en un gel de acrilamida al 7% se encontró que la banda cercana a 100 kDa en realidad es una composición de dos bandas (Figura 9D), una de las cuales efectivamente tiene los 100 kDa esperados para la quimera EGFP-Capn5 y una segunda banda de 87 kDa, tamaño consistente con la pérdida de 13 kDa (Figura 9E). Esto indica que una fracción importante de la calpaína 5 expresada heterológamente podría ser activa.

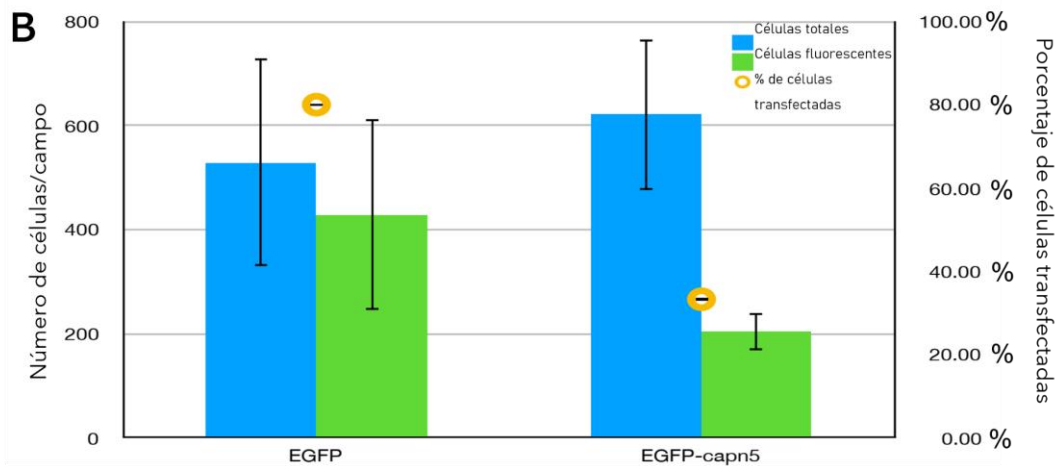
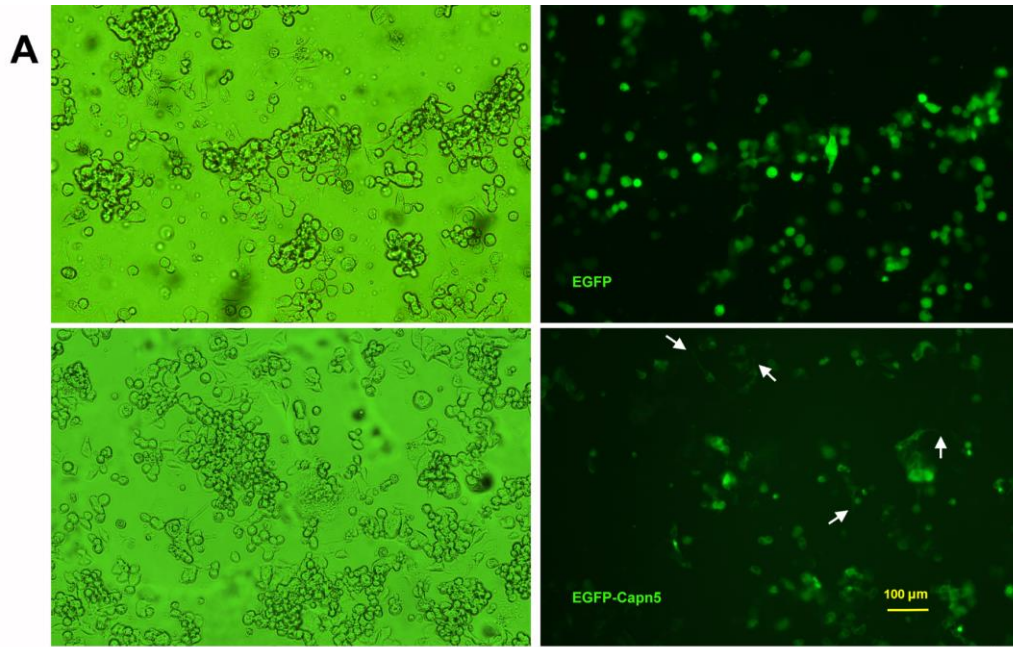


Figura 8. Eficiencia de transfección de células N1E-115. **A.** Micrografías representativas de los experimentos de transfección con EGFP y EGFP-Capn5. Las células fueron observadas en transiluminación (izquierda) o fluorescencia (derecha) a 10x, 48 h después de llevar a cabo la transfección. Las flechas señalan algunos procesos celulares teñidos de verde fluorescente. **B.** Resumen de tres experimentos. La eficiencia de transfección es el porcentaje de células fluorescentes respecto de las células totales observadas en cada campo ($n=3$). Se graficó el número total de células (azul) y el número total de células fluorescentes (verde). También se calculó el porcentaje de transfección en cada condición (círculos amarillos). En las células que expresan EGFP se observó un 80.01% de transfección y aquellas que expresan EGFP-Capn5 alcanzaron un 33.20%. No se detectó diferencia significativa en el número total de células tras la transfección de EGFP-Capn5 con respecto a las células transfectadas con EGFP ($p=0.625$).

En buen acuerdo con las bandas detectadas, el programa GPS-CCD 1.0 predijo un sitio de corte en la secuencia de calpaína 5 entre la G773 y la A774 (Figura 7B), cuyo rompimiento produciría una banda de 12.6 kDa y otra de 88.3 kDa. Cabe señalar que el programa también predijo otros sitios de corte, para los cuales no se encontraron bandas de tamaño consistente con la predicción o las bandas fueron muy poco intensas. Por ejemplo, el programa predijo un sitio de corte entre la G563 y la V564, lo que daría origen a una banda de 64 kDa que conservaría la señal de EGFP. En la Figura 9A se observa una tenue banda de poco más de 63 kDa. Sin embargo, un corte a esa altura afectaría la actividad de la proteasa ya que se encuentra dentro del dominio catalítico.

9.4 Detección de los canales de sodio por *western blot*.

9.4.1 Las células N1E-115 no expresan Nav_v1.2 en cantidades detectables.

De acuerdo con Hirsh & Quandt (1996), Benzinger et al. (1999) y Jo & Bean (2011), las células N1E-115 expresan mRNA de Nav_v1.2, Nav_v1.3 y Nav_v1.7, sin embargo, hasta donde sabemos, no se ha verificado la expresión de cada uno de estos subtipos de Nav_s en forma de proteína. Ya que, tanto Hirsh & Quandt (1996) como Benzinger et al. (1999) encontraron que el mRNA del subtipo Nav_v1.2 es el más abundante en esta línea celular, comenzamos por analizar Nav_v1.2 en las células experimentales. Así pues, se realizó un ensayo de *western blot* con un anticuerpo monoclonal anti-Nav_v1.2 con muestras provenientes de varios experimentos de transfección ($n=3$); sin embargo, no fue posible detectar el canal de sodio Nav_v1.2.

Para confirmar que el anticuerpo anti-Nav_v1.2 efectivamente reconociera el blanco para el que fue creado, se realizó un experimento de co-transfección del vector pEGFP-Capn5 con dos plásmidos que codifican el carboxilo terminal de Nav_v1.2 (pEGFP-Nav_v1.2CT-FLAG) o de Nav_v1.6 (pEGFP-Nav_v1.6CT-FLAG) (Figura 10A, B y C). En la Figura 11A se observa un experimento de *western blot* con un anticuerpo anti-Nav_v1.2 que reconoce la proteína quimérica pEGFP-Nav_v1.2CT, de aproximadamente 60 kDa, pero no detecta ninguna otra banda, lo que sugiere que las células N1E-115 no expresan canales Nav_v1.2 en cantidades detectables, al menos bajo las condiciones de cultivo y extracción de proteínas usadas en este proyecto. Asimismo, ya que las construcciones pEGFP-Nav_v1.2 y pEGFP-Nav_v1.6 también contienen una señal FLAG en el extremo carboxilo, se utilizó un anticuerpo anti-FLAG para verificar la expresión de las dos proteínas quiméricas y buscar bandas de proteólisis. El *blot* contra la secuencia FLAG se puede observar en la Figura 11B. Las proteínas de fusión de EGFP con los carboxilos de Nav_v1.2 o Nav_v1.6 fueron detectadas (~60 kDa y ~57 kDa, respectivamente), pero la ausencia de bandas de menor peso molecular sugiere que la calpaína 5 no encuentra un sitio de corte en el CT del Nav_v1.2 o del Nav_v1.6

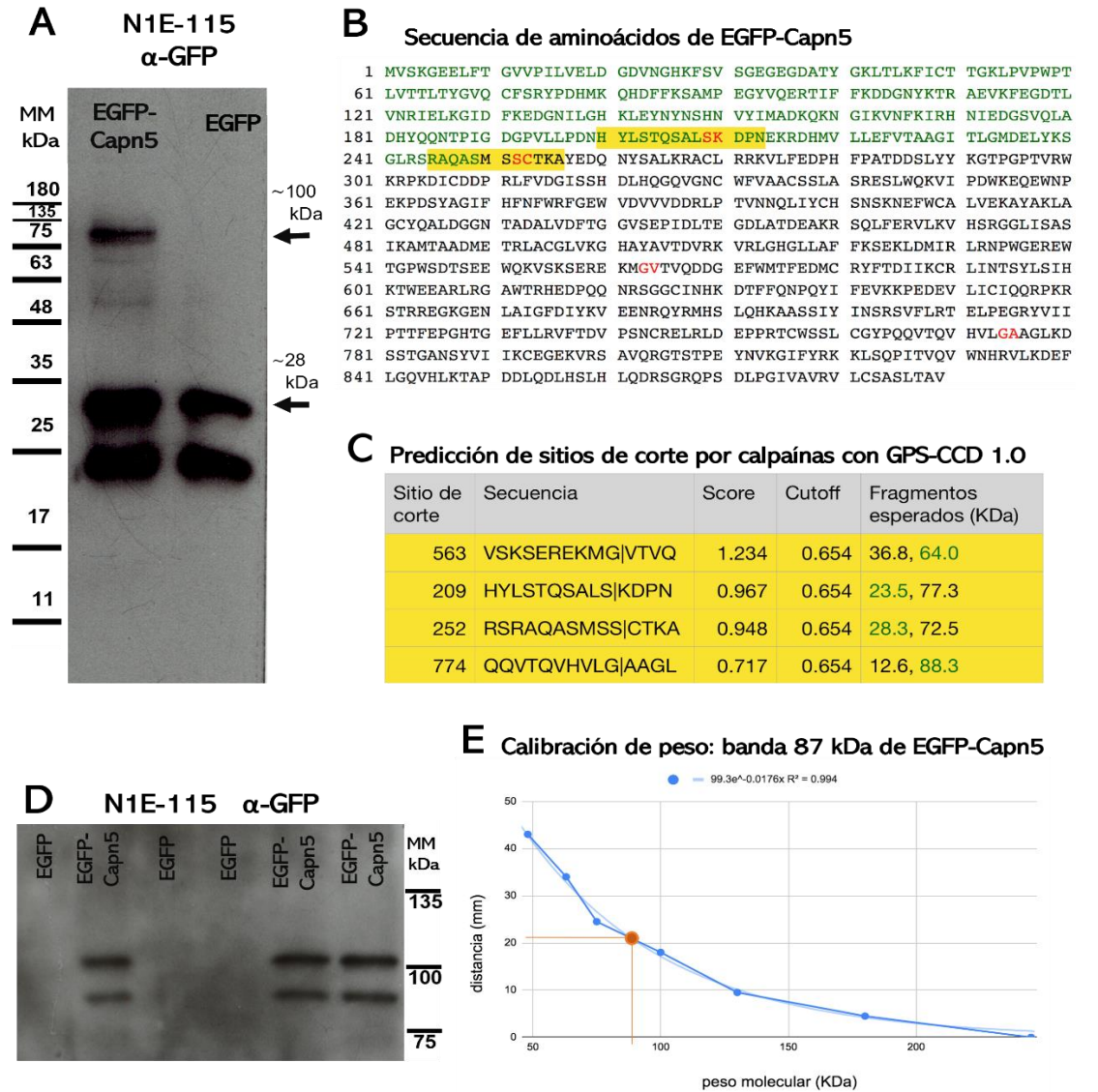


Figura 9. Expresión heteróloga en células N1E-115 y predicción de proteólisis de la quimera EGFP-Capn5 por calpaínas. **A.** Inmunodetección de proteínas quiméricas con anti-GFP. La presencia de múltiples bandas puede ser producto de la proteólisis por calpaína 5 (ver texto). **B.** Secuencia completa de aminoácidos de la quimera EGFP-Capn5, en verde los aminoácidos que corresponden a la EGFP y en negro la secuencia de la calpaína 5. Los aminoácidos en rojo corresponden a los posibles sitios de corte indicados en C. En **C**, predicciones del GPS-CCD 1.0 y fragmentos esperados. En verde se indican los pesos de los fragmentos que conservarían la EGFP después del corte. **D.** Inmunodetección con anti-GFP a partir de un gel de 7% acrilamida. Las células transfectadas con EGFP-Capn5 presentan inmunoreactividad en el rango de 75 a 100 kDa ($n=3$); no así las células control transfectadas con EGFP ($n=3$). **E.** Curva de calibración para estimar el peso molecular de la banda de proteólisis de la quimera EGFP-Capn5. La línea corresponde al ajuste a partir del cual obtuvimos la ecuación para calcular con precisión el peso de la banda. Este se calculó en 86.94 kDa (círculo naranja).

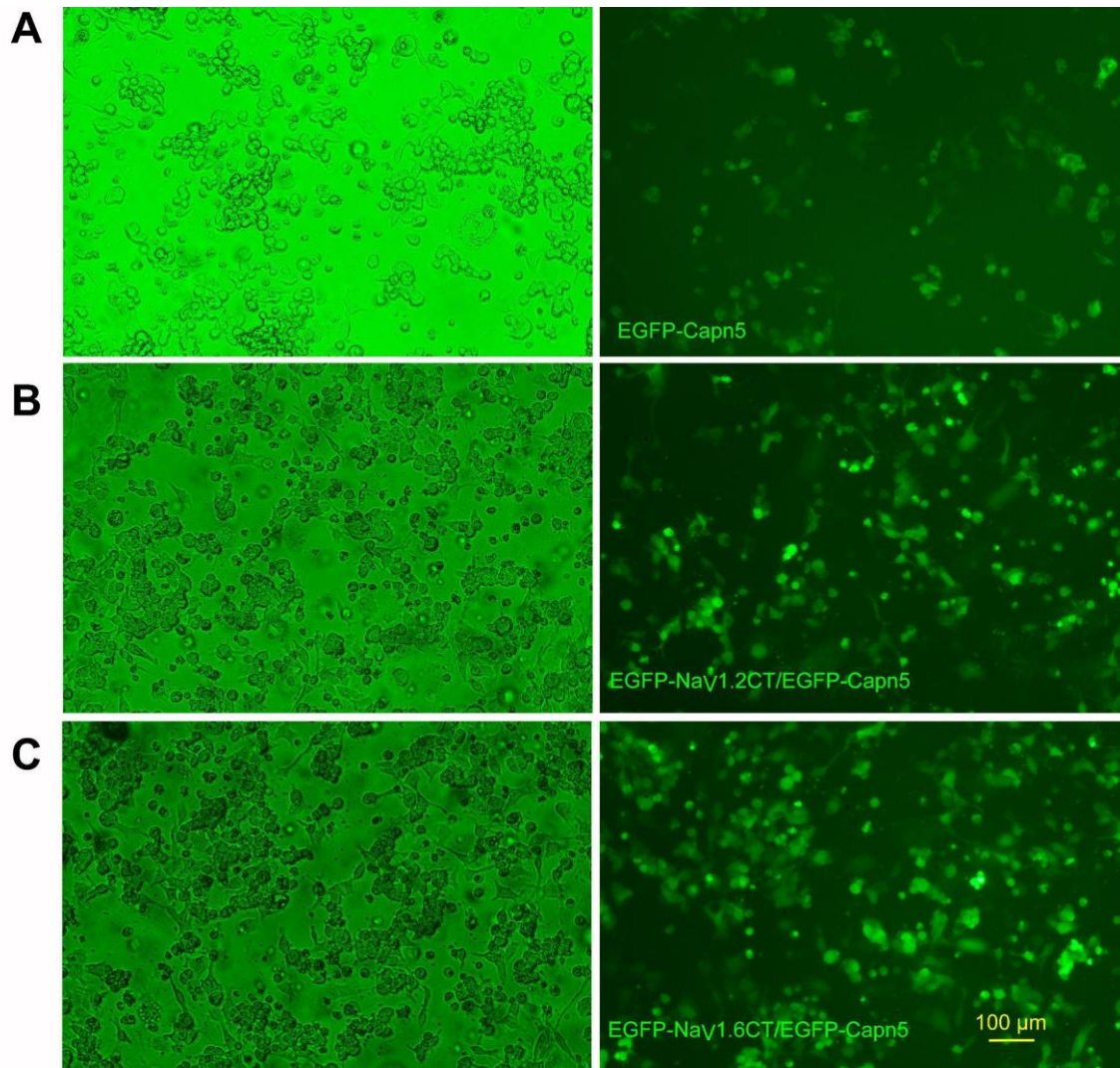


Figura 10. Experimento de co-transfección de células N1E-115 con Capn5 y canales de sodio. Micrografías en transiluminación (derecha) o fluorescencia (izquierda) de células co-transfectadas con: **A.** EGFP-Capn5; **B.** EGFP-Capn5/EGFP-Nav1.2CT; y **C.** EGFP-Capn5/EGFP-Nav1.6CT. Para todas las transfecciones se utilizó una proporción PEI:DNA 1:4. Se estimó un 80% de eficiencia de transfección en las dos co-transfecciones de EGFP-Capn5 con canales de sodio, y un 33% de eficiencia en la transfección simple de EGFP-Capn5.

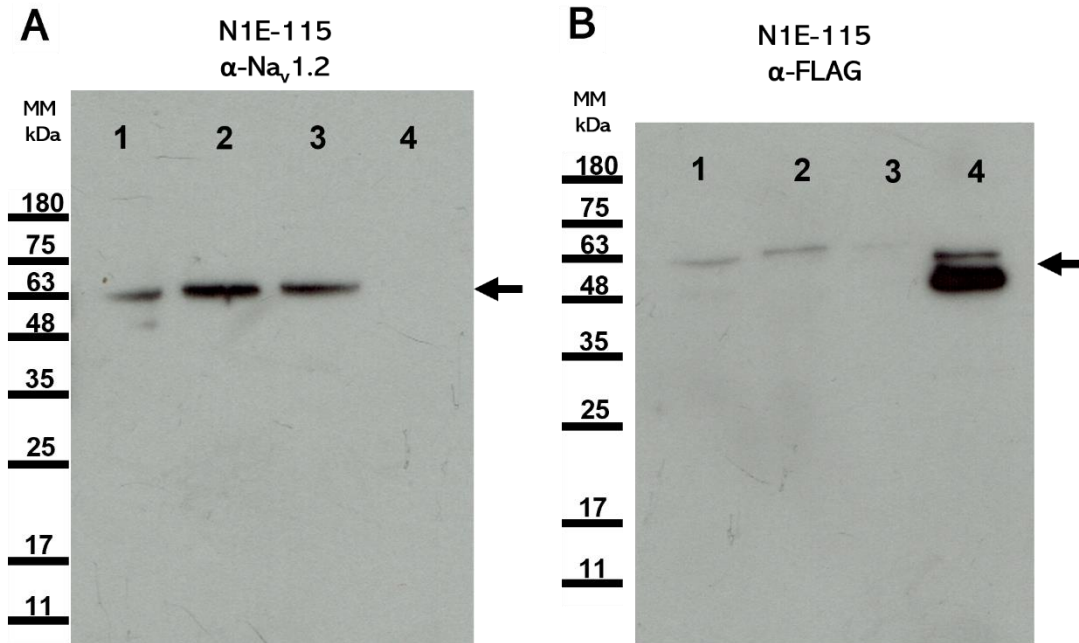


Figura 11. Inmunodetección por *western blot* en lisados de células N1E-115 co-transfectadas. Muestras co-transfectadas con Capn5 y Nav1.2CT (carriles 1-3) o Capn5 y Nav1.6CT (carril 4) en las dos inmunodetecciones. **A.** En el *blot* contra Nav1.2 se observan bandas de aproximadamente 60 kDa, que se corresponden con lo esperado para la construcción del carboxilo terminal del Nav1.2 en fusión con la EGFP. Sin embargo, no se observan bandas de menor peso molecular, ni en las co-transfecciones con Nav1.2CT ni con Nav1.6CT. **B.** En el *blot* contra FLAG se observa, de igual modo, señal de alrededor de 60 kDa tanto en las muestras co-transfectadas con Capn5/Nav1.2 como con Capn5/Nav1.6. Se aprecia una intensa señal de unos 55 kDa del Nav1.6.

expresados de forma heteróloga. Alternativamente, es posible que la calpaína 5 aun estando sobreexpresada no estuviera activada; sin embargo, como se explica en la sección anterior y en la discusión, la presencia de los productos de proteólisis de EGPF-Capn5 parece indicar que sí tenía actividad.

9.4.2 Detección de Nav_v 1.7 nativos de las células N1E-115.

A continuación, se investigó la expresión del subtipo Nav_v1.7 en las N1E-115, así como la integridad de la proteína en las células transfectadas con EGFP y EGFP-Capn5. Por medio de *western blot* se identificó una proteína con un peso cercano a 245 kDa, resultado que nos indica que el neuroblastoma N1E-115 sí expresa el subtipo Nav_v1.7 a nivel de proteína (Figura 12A), dado que el peso predicho para la proteína de la subunidad α del subtipo Nav_v1.7 es de

aproximadamente 226 kDa (The UniProt Consortium, 2021; número de acceso: Q62205). Cabe señalar que esta es la primera vez que se publica evidencia de la expresión de la proteína Nav1.7 en las células N1E-115. Por otro lado, a partir de la densitometría de las bandas se determinó que la expresión heteróloga de EGFP-Capn5 no induce cambios en la abundancia de proteína del Nav1.7 o en su integridad en las células N1E-115, en comparación con la abundancia y la integridad de esta isoforma del canal en las células que expresan EGFP (Figura 12C). Conforme con este argumento, conviene aclarar que se tomó la previsión de cargar exactamente la misma cantidad de proteína en cada uno de los carriles del gel de acrilamida en la electroforesis de estas muestras, y en efecto estimamos la misma densidad para ambos carriles en el gel teñido con azul de Coomassie (Figura 12B).

10. Discusión.

Los canales de sodio dependientes de voltaje, así como varias isoformas de calpaínas están presentes en neuronas del sistema nervioso central y del sistema nervioso periférico. Desde la década de los 90, y cada vez con más detalle, se ha correlacionado la actividad proteolítica de las calpaínas con funciones propias de las neuronas centrales, tales como plasticidad y remodelación sináptica, señalización celular, proliferación y apoptosis (Amini, et al., 2013). Las calpaínas se han estudiado principalmente en escenarios como el daño neuronal severo por lesiones traumáticas o isquémicas (Jette et al., 2006; Liu et al., 2008; Von Reyn et al., 2009; Wang et al., 2016), o también en modelos de hiperglucemia, donde dicha activación contribuye a la etiología de la neuropatía diabética (Kharatmal et al., 2015); sin embargo, se sabe muy poco de su papel e incluso de su actividad en condiciones basales.

Por otra parte, un evento común en las neuropatologías es la modulación de las corrientes de sodio (Brocard et al., 2016; Kharatmal et al., 2015) y, en el caso de la lesión traumática e isquémica, se ha descrito la degradación de los subtipos Nav1.2 y Nav1.6 mediada por calpaína 1 (Brocard et al., 2016; Von Reyn et al., 2009); sin embargo, la participación de otras calpaínas en dichos procesos de degradación de los canales de sodio permanece ampliamente inexplorada. La calpaína 5 ha llamado la atención por su participación en el desarrollo de retinopatías. Por ejemplo, algunas mutaciones puntuales en el gen de calpaína 5 resultan en una proteasa hiperactiva, responsable de la vitreorretinopatía neovascular inflamatoria hereditaria autosómica (ADNIV) tanto en modelos murinos como en humanos (Mahajan et al., 2012; Wert et al., 2014). Para comenzar a llenar los vacíos en lo que sabemos de esta proteína, en este trabajo usamos células que expresan canales de sodio de forma nativa, y expresamos de forma heteróloga la calpaína 5.

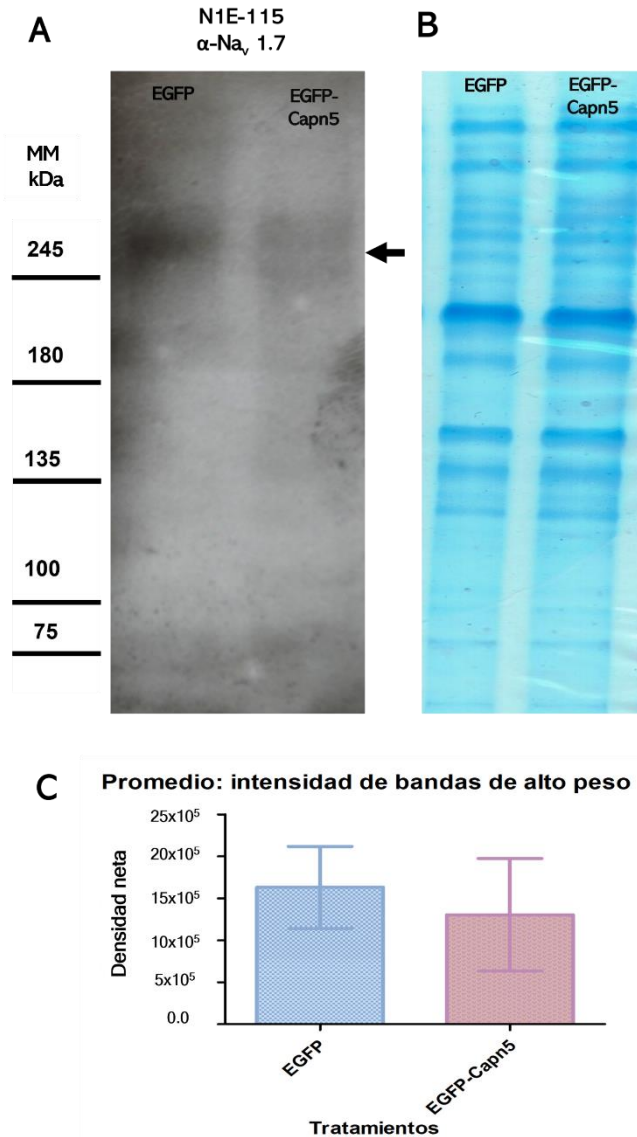


Figura 12. La isoforma completa de Nav_v1.7 no parece ser afectada por la expresión de EGFP-Capn5 en las células N1E-115. **A.** *Western blot* representativo ($n=2$) de las células N1E-115 transfectadas con EGFP o EGFP-Capn5. En ambos carriles, las señales producidas por el anticuerpo monoclonal anti-Nav_v1.7 coinciden con el peso esperado para la proteína de tamaño completo (~250 kDa). Sin embargo, no se observaron fragmentos de degradación del Nav_v1.7 en el rango de peso molecular de 75 a 245 kDa. **B.** Tinción de azul de Coomassie de un gel de 7 % acrilamida, en el cual se separaron las muestras de células transfectadas con EGFP o EGFP-Capn5. Se realizó una densitometría de los dos carriles y se comprobó que la cantidad de proteína que se cargó es la misma en ambos carriles. **C.** Resumen de la densitometría realizada para los *blots* contra Nav_v1.7 ($n=2$). La intensidad de las bandas detectadas en las muestras transfectadas con EGFP-Capn5 no difiere significativamente de la intensidad observada en las muestras transfectadas con EGFP ($p=0.678$).

10.1 Expresión heteróloga de EGFP-Capn5.

En este trabajo se clonó el cDNA de la calpaína 5 de rata en el plásmido recombinante pEGFP-C2, lo que permitió su expresión de manera heteróloga en fusión con la proteína fluorescente EGFP en células N1E-115 en cultivo. Cabe notar que en la etapa de amplificación por PCR de la calpaína 5 se obtuvieron dos productos principales, uno cuyo peso molecular fue similar al predicho por la secuencia codificante de calpaína 5 y uno corto de ~500 pb. Existe la posibilidad de que este último producto de PCR fuese una variante de *splicing* de calpaína 5, como las que se han reportado para otras calpaínas. Por ejemplo, la calpaína 10 tiene al menos ocho variantes de *splicing*, las cuales se distribuyen de manera diferencial en distintos tejidos en humanos (Horikawa et al., 2000). Vale decir que Horikawa y colaboradores (2000), después de clonar dichas variantes, predijeron que dos de ellas, la calpaína 10g y la calpaína 10h, corresponden a variantes cortas de cerca de 138 aminoácidos. Ambas variantes fueron detectadas a nivel de mRNA en islotes pancreáticos y la calpaína 10g también en músculo esquelético. Sin embargo, ninguna de las proteínas de dichas variantes de calpaína 10 ha sido descrita a la fecha.

La expresión heteróloga de calpaínas ha sido un reto para varios grupos de investigación, debido a la pobre producción de estas proteínas en diversos sistemas de expresión; por ejemplo, la calpaína 1 y la calpaína 2 de rata, las isoformas más estudiadas de calpaína. Estas calpaínas requieren co-expresar la subunidad catalítica junto con el dominio C-terminal de la subunidad reguladora (dominio VI) para que las proteasas recombinantes sean activas y se expresen abundantemente (Larsen et al., 2004; McCartney & Davies, 2019). Utilizando dicha estrategia, Larsen y colaboradores (2004) expresaron Capn2-EGFP en fibroblastos murinos TAg-*capn4*^{-/-} y reportaron haber logrado una eficiencia de transfección del 5-10% a juzgar por la fluorescencia presente en los fibroblastos. Los ensayos de actividad de la Capn2-EGFP que ellos extrajeron de los fibroblastos mostraron que la calpaína 2 de rata es también activa en co-expresión con la subunidad reguladora completa de 28 kDa. Sin embargo, en el caso de la calpaína 5 no se conocen subunidades auxiliares que regulen su actividad.

Con respecto a la expresión heteróloga calpaína 5, sabemos que Wert y colaboradores en 2014, reportaron la expresión de calpaína 5 humana en coexpresión con GFP mediante transfección con un vector lentiviral en células 293T o en retinas de ratones, sin efectos adversos (Wert, et al., 2014), aunque cabe mencionar que no hicieron análisis de la integridad de la proteína calpaína 5. Sin embargo, encontraron que el 20% de células de retina expresaban la GFP desde el día de la transfección hasta que finalizó el estudio (un periodo de 175 días), lo que se considera una medida indirecta de la expresión de la calpaína 5 heteróloga. Por otra parte, Bondada y colaboradores (2021) realizaron un estudio sobre la autólisis de calpaína 5 y la función del dominio C2 de ésta para su localización subcelular en células SH-SY5Y. Para ello transfectaron

de manera estable calpaína 5 humana con una señal 3xFlag, ya que estimaron que los niveles de calpaína 5 endógena de las SH-SY5Y eran bajos. Su método de transfección se basó en la utilización de lípidos catiónicos fluorados (reactivo LipoJet™), lo cual permitió una expresión relativamente alta de calpaína 5; sin embargo, la detección de la calpaína 5 mediante *inmunoblot* requirió de largas incubaciones (48 a 72 h) con el anticuerpo primario.

En este proyecto se eligió el método basado en PEI para realizar la transfección de las células N1E-115 debido a que este es un agente de lipofección apto para la transfección transitoria de células de mamífero, que ha emergido como una importante alternativa a reactivos costosos como Lipofectamine™, con la clara ventaja de que las células sobreviven mejor al proceso de transfección (Longo et al., 2012). Además, en los últimos años se han desarrollado mejoras en los protocolos de transfección basada en PEI que han permitido un considerable aumento de la eficiencia (alrededor de 80% de transfección) y reproducibilidad del procedimiento (Yang et al., 2017). Nuestras observaciones indican que el método de transfección transitoria con PEI tiene alta efectividad en las células N1E-115, puesto que estimamos una eficiencia del 80.01% en las células transfectadas con pEGFP. De manera interesante, aunque se usó la misma cantidad de picomoles que para el pEGFP y la misma proporción de PEI:DNA, en aquellas células transfectadas con pEGFP-Capn5 se obtuvo una eficiencia de transfección mucho menor, con sólo el 33.20% de células fluorescentes en cada observación. La baja eficiencia en la expresión de EGFP-Capn5 podría ser consecuencia de algún procesamiento que sufre la proteína recombinante; ya que los *blots* contra GFP señalan que las N1E-115 pueden sintetizar a la proteína de fusión EGFP-Capn5 del tamaño esperado (~100.86 kDa). Sin embargo, se liberaron dos bandas, una del tamaño esperado para la EGFP sola (~28 kDa) y otra más de 23 kDa, por lo que suponemos que dicha banda fue liberada mediante proteólisis del extremo amino de la calpaína 5. Si bien, este análisis requiere de un control negativo en el cual se pruebe al anti-GFP contra las células de neuroblastoma N1E-115 no transfectadas, ó transfectadas con un plásmido que no codifique para GFP.

10.2 Degradación de la proteína recombinante EGFP-Capn5.

Ambas proteínas exógenas, EGFP y EGFP-Capn5, fueron blancos de proteólisis parcial en las células N1E-115. En las células transfectadas con EGFP encontramos dos bandas inmunoreactivas de ~28 kDa y de ~23 kDa; esta última banda es presumiblemente una isoforma degradada. De manera similar, en las células transfectadas con EGFP-Capn5 el anticuerpo contra EGFP reconoció varias bandas, las más prominentes fueron las de ~28 kDa, ~23 kDa, ~87kDa y ~100 kDa. La banda de 100 kDa corresponde al tamaño esperado para la proteína de fusión completa, pero las bandas de ~28 y 23 kDa parecen ser producto de proteólisis hacia el extremo amino de la calpaína 5. La proteólisis del extremo amino estaría en buen acuerdo con lo

que se sabe sobre la activación de las calpaínas clásicas, en donde iones de Ca^{2+} se unen a residuos de aminoácidos de los dominios II, III, IV y VI, y esta unión con Ca^{2+} induce cambios dinámicos en la conformación de la calpaína, incluyendo la autólisis del dominio N-terminal y posteriormente su desplazamiento (Goll et al., 1992; Ono & Sorimachi, 2012; Suzuki et al., 2004). Por tal motivo, cabe la posibilidad de que la aparición de la EGFP prácticamente entera (28 kDa aprox.) en los neuroblastomas que expresan EGFP-Capn5 sea consecuencia de la autólisis del N-terminal de la proteína de fusión, y probablemente la activación de la calpaína 5. Aunque la degradación de la EGFP nos sugiere la posibilidad de que haya ocurrido una activación de la calpaína 5, debemos ahondar en el estudio de este fenómeno, ya que nuestro análisis no incluyó la cuantificación de la actividad enzimática de calpaína, y tampoco se realizó ningún procedimiento ad hoc para promover la activación de calpaínas.

La autoproteólisis del extremo amino también se ha observado con una fusión de calpaína 2 con EGFP (Capn2-EGFP) transfectada en fibroblastos murinos, donde Larsen y colaboradores (2004) encontraron que la proteína recombinante era activa, y nuevamente observaron la generación de fragmentos de proteólisis a partir del extremo amino de la calpaína 2 lo que resultaba en la liberación de la EGFP.

Por otro lado, Bondada y colaboradores (2021), al estudiar la autólisis de calpaína 5 de origen humano en el neuroblastoma SH-SY5Y, encontraron un patrón de proteólisis diferente. En sus experimentos la calpaína 5 heteróloga se autoproteolizó escindiendo de manera secuencial varios fragmentos del C-terminal, lo que resulta en una pérdida total de ~13 kDa y en la liberación de varios péptidos. Dicha autólisis libera toda la región C-terminal y la mayor parte del dominio C2 de la calpaína 5, generando un producto principal de ~61 kDa detectado principalmente en la fracción de membranas. Dicha degradación se previene cuando se inserta una mutación de un aminoácido catalítico (C81A) que produce una enzima inactiva, lo que sugiere fuertemente que los fragmentos son producidos por autoproteólisis (Bondada et al., 2021). La aparición de una especie de ~87 kDa en el *blot* con anti-GFP, es consistente con la pérdida del extremo carboxilo, similar a lo reportado por Bondada y colaboradores (2021), lo que sugiere que la calpaína 5 heteróloga estaba activa en las células N1E-115 y muy probablemente se autoproteolizó. Sin embargo, nuestros resultados indican también que el extremo amino de la calpaína 5 se escinde, liberando dos péptidos de ~28 kDa y de ~23 kDa. En apoyo de esta observación, el análisis *in silico* que realizamos con el software GPS-CCD 1.0 nos señala que hay una alta probabilidad de que las calpaínas clásicas corten en sitios que generarían estos productos; es decir, en la posición 209 de la EGFP-Capn5 para generar un producto de 23.5 kDa (más otro de 77.3 kDa), y también en la posición 252 para dar origen a un fragmento de 28.3 kDa (más otro de 72.5 kDa). Cabe señalar que el primer corte en la posición 209, podría modificar las

propiedades de excitación o emisión de la EGFP, ya que se ha documentado que mutaciones en esta región tienen dicho efecto en la GFP (Park & Rhee, 2012; Ehrig et al., 1995), lo que podría explicar por qué la eficiencia de la transfección, medida por la fluorescencia de la EGFP, es menor que para la EGFP sola. En este sentido, una explicación alternativa es que la estructura de la calpaína 5 podría interferir con las propiedades de excitación de la EGFP.

Desde otro punto de vista, se puede proponer que las bandas de proteólisis observadas en nuestros experimentos no son necesariamente productos de autoproteólisis, ya que la proteína recombinante EGFP-Capn5 completa podría ser blanco de otras peptidasas. Por ejemplo, Raschmanová y colaboradores (2018) utilizaron métodos de DNA recombinante para producir una quimera de EGFP-tripsinógeno (precursor de la tripsina) de cerdo en la levadura *Pichia pastoris* e, inesperadamente, encontraron que la EGFP era separada del tripsinógeno. Ellos concluyeron que la EGFP fue escindida por una proteasa endógena no identificada, que incrementa su actividad a pH 5.9, y que encuentra un sitio de corte en los últimos aminoácidos del C-terminal de la EGFP, liberando a la proteína fluorescente completa. Asimismo, Raschmanová descarta que la proteólisis se debiera a la actividad de proteasas involucradas en procesos de apoptosis o a la actividad de la misma tripsina, y señalan que la estructura específica de la quimera podría ser la característica que facilita el reconocimiento y corte por la proteasa responsable (Raschmanová et al., 2018). Realizar la secuenciación N-terminal de los fragmentos de proteólisis de la EGFP-Capn5 en nuestros experimentos nos permitirá hacer una propuesta más consistente acerca del sitio de corte.

10.3 Perfil de expresión de los Navs.

Previo al análisis de proteólisis, fue necesario explorar la expresión de los canales de sodio endógenos de las células N1E-115 a nivel de proteína, ya que hasta donde sabemos nunca se había determinado la expresión de isoformas específicas de canales de sodio dependientes de voltaje a nivel de proteínas. En estudios anteriores se indicaba que las células N1E-115 expresan el mRNA de Nav1.2, Nav1.3 y Nav1.7 (Hirsh & Quandt, 1996; Benzinger et al., 1999, Jo & Bean, 2011). Sin embargo, los trabajos iniciales de Hirsh y Quandt reportaron que el mRNA de Nav1.2 era la isoforma predominante, mientras que Benzinger et al. (1999), reportaron una frecuencia de clonación de Nav1.2 > Nav1.7 > Nav1.3. En contraste Jo & Bean (2011), usando *primers* diseñados por Gao et al. (2009), sólo lograron amplificar por PCR Nav1.3. Sin embargo, al analizar nosotros la secuencia de estos *primers* usando la herramienta Blast, del NCBI, encontramos que dichos oligonucleótidos son inespecíficos y capaces de amplificar otras isoformas de mRNAs de canales de sodio. Por ello, los primeros experimentos de este proyecto estuvieron encaminados a examinar la expresión y cambios de Nav1.2, pero contrario a lo previsto, Nav1.2 fue indetectable. A pesar de esto, en un esfuerzo por determinar si la calpaína 5

podría proteolizar Nav1.2, usamos una construcción que codifica el extremo carboxilo terminal de Nav1.2 en co-transfección con el pEGFP-Capn5. Nuestra conclusión fue que al menos esta región del Nav1.2 no es blanco de la calpaína 5. Algo similar ocurrió con el extremo carboxilo del Nav1.6. No obstante, dado que los canales tienen largas cadenas peptídicas en el extremo amino y las asas intracelulares I-II y II-III, no descartamos que pueda haber algún sitio de corte para estos canales. En este sentido, estudios previos sugieren, por ejemplo, que la calpaína 1 corta Nav1.2 en las asas I-II y II-III (Brocard et al., 2016; Von Reyn et al., 2009), por lo que en un futuro próximo esperamos poder usar plásmidos con la secuencia completa de estos dos canales para determinar si los subtipos Nav1.2 y Nav1.6 son o no blancos de calpaína 5, como lo son de calpaína 1.

Ante la ausencia de Nav1.2, decidimos enfocarnos en la expresión del subtipo Nav1.7 en células N1E-115. El Nav1.7 ha sido motivo de gran interés en el campo del dolor neuropático, porque se expresa de forma nativa en neuronas sensoriales, donde se ha visto que su expresión es regulada positivamente en modelos de dolor neuropático (Hong et al., 2004). Los resultados obtenidos muestran que las células N1E-115 expresan cantidades detectables del canal de sodio Nav1.7 pero, hasta donde pudimos observar, la transfección de la calpaína 5 no tuvo un efecto en la degradación de los canales de sodio Nav1.7. La interpretación más directa de este resultado es que Nav1.7 no es blanco de la calpaína 5 en concentraciones basales de calcio. Cabe mencionar que los datos sobre los requerimientos de calcio para la activación de la calpaína 5 no están claros. Por ejemplo, según Vélez y colaboradores (2020) la actividad media máxima del dominio Cys-Pc (núcleo proteasa) aislado de calpaína 5 ocurre a una concentración de ~12 mM de Ca²⁺, la cual es dos órdenes de magnitud mayor que la concentración de Ca²⁺ intracelular que normalmente alcanzan las células, misma que oscila entre 100-800 nM de Ca²⁺ libre (Goll et al., 1992). Sin embargo, Vélez midió la actividad del dominio Cys-Pc *in vitro* y en ausencia de los dominios reguladores CBSW y C2, los cuales contienen sitios de unión a calcio extra, lo que podría conferir una mayor sensibilidad al calcio. En buen acuerdo con esta idea, Bondada y colaboradores (2021) encontraron que la autoproteólisis de la calpaína 5 intacta se produce a una concentración de entre 80 µM y 200 µM de Ca²⁺ en lisados de células SH-SY5Y transfectados con calpaína 5. Con todo, el requerimiento de Ca²⁺ para la actividad catalítica de calpaína 5 es elevado, por lo que cabe la posibilidad que nuestra calpaína 5 heteróloga tuviera una actividad reducida en las condiciones experimentales utilizadas. Sin embargo, la escisión del EGFP de la proteína quimérica nos hace pensar que la calpaína 5 sí pasó por un proceso de autoproteólisis y activación, como se explicó en el apartado anterior.

10.4 Las células N1E-115 podrían ser útiles para el estudio del dolor mediado por Nav1.7 y en relación con la señalización adrenérgica.

Una contribución importante del presente trabajo es la identificación de Nav_v1.7 nativos en las células N1E-115. Hasta donde sabemos este dato no ha sido reportado antes y pudiera ser de interés en el estudio del dolor neuropático. El subtipo de canal de sodio Nav_v1.7 se expresa principalmente en neuronas sensoriales del ganglio de la raíz dorsal, en neuronas de los ganglios simpáticos y también en neuronas nociceptoras del ganglio trigeminal, mismas que se originan en el sistema nervioso periférico (Bi et al., 2017; Waxman, 2006). Algunas anomalías genéticas en humanos han mostrado claramente que el Nav_v1.7 tiene una función relevante en la señalización del dolor, ya que mutaciones del gen *SCN9A* que provocan la pérdida de función del Nav_v1.7 ocasionan en los pacientes una incapacidad para percibir dolor (Cox et al., 2006), mientras que aquellas mutaciones que causan una hiperactividad de este canal contribuyen a ciertos síndromes de dolor exacerbado (Han et al., 2006; Fertleman et al., 2006). También cabe mencionar que un conjunto de evidencias apunta a que este canal es regulado positivamente en la alodinia (Hoffman et al., 2018; Kingwell, 2019). Por todo lo antes mencionado, pensamos que las células de neuroblastoma N1E-115 podrían ser de enorme valor como modelo de estudio de la regulación de los fenómenos de dolor donde el Nav_v1.7 es protagonista.

11. Conclusiones.

1. En el presente trabajo reportamos por primera vez la expresión del subtipo Nav_v1.7 del canal de sodio en las células N1E-115.
2. La proteína recombinante EGFP-Capn5 no proteoliza al Nav_v1.7, al menos en las condiciones basales de cultivo y extracción que utilizamos.
3. Los resultados sugieren que las N1E-115 no expresan el subtipo Nav_v1.2 en cantidades detectables, a pesar de que esta isoforma ha sido detectada a nivel de mRNA por algunos autores (Benzinger et al., 1999; Hirsh & Quandt, 1996; Jo & Bean, 2011).
4. Registramos productos de proteólisis de la proteína heteróloga EGFP-Capn5 y de EGFP en las células transfectadas.
5. El análisis del tamaño de los productos de proteólisis nos sugiere que la calpaína 5 probablemente se autolizó y se activó en nuestros experimentos, pero no interactuó con el Nav_v1.7.

12. Referencias.

Alexander, S. P. H., Mathie, A., Peters, J. A., Veale, E. L., Striessnig, J., Kelly, E., Armstrong, J. F., Faccenda, E., Harding, S. D., Pawson, A. J., Sharman, J. J., Southan, C., Davies, J. A. & CGTP Collaborators. (2019). THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2019/20: Ion channels. *British Journal of Pharmacology*. 176 Suppl 1(Suppl 1): S142-S228.

<https://doi.org/10.1111/bph.14749>

Alexandrou, A. J., Brown, A. R., Chapman, M. L., Estacion, M., Turner, J., Mis, M. A., Wilbrey, A., Payne, E. C., Gutteridge, A., Cox, P. J., Doyle, R., Printzenhoff, D., Lin, Z., Marron, B. E., West, C., Swain, N. A., Storer, I., Stuppel, P. A., Castle, N. A., Hounshell, J. A., Rivara, M., Randall, A., Dib-Hajj, S. D., Krafte, D., Waxman, S. G., Patel, M. K., Butt, R. P. & Stevens, E. (2016) Subtype-Selective Small Molecule Inhibitors Reveal a Fundamental Role for Nav1.7 in Nociceptor Electrogenesis, Axonal Conduction and Presynaptic Release. *PLOS ONE* 11(4): e0152405.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152405>

Abriel, H., Rougier, J. S., & Jalife, J. (2015). Ion channel macromolecular complexes in cardiomyocytes: roles in sudden cardiac death. *Circulation Research*, 116(12), 1971–1988.

<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305017>

Amano, T., Richelson, E., & Nirenberg, M. (1972). Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*: 69(1), 258–263.

<https://doi.org/10.1073/pnas.69.1.258>

Amini, M., Ma, C. L., Farazifard, R., Zhu, G., Zhang, Y., Vanderluit, J., Zoltewicz, J. S., Hage, F., Savitt, J. M., Lagace, D. C., Slack, R. S., Beique, J. C., Baudry, M., Greer, P. A., Bergeron, R., & Park, D. S. (2013). Conditional disruption of calpain in the CNS alters dendrite morphology, impairs LTP, and promotes neuronal survival following injury. *Journal of Neuroscience*, 33(13), 5773–5784. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4247-12.2013>

Armstrong, C. M. & Hille, B. (1998) Voltage-gated ion channels and electrical excitability. *Neuron*, 20(3), 371–380. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80981-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80981-2)

Arratia-Cortés, L. M. (2014). Regulación de la expresión de mRNAs de CAPN10 en células de neuroblastoma en respuesta a la elevación de glucosa. Tesis de licenciatura, UNAM. Dirección general de Bibliotecas, UNAM. <http://132.248.9.195/ptd2014/octubre/0721447/Index.html>

Arratia-Cortés, L. M. (2018). Efecto de la hiperglicemia sobre la expresión de las calpaínas y la proteólisis de los canales de sodio dependientes de voltaje en cerebro de rata. Tesis de maestría del programa de Posgrado en Ciencias Químico-Biológicas, IPN.

- Arratia-Cortés, L. M., Vilches-Flores A., Vega, A. V. (2014). Up-regulation of calpain 10a in response to glucose and its possible interaction with sodium channels. Washington DC. November 15-19. Society for Neuroscience, 2014. Abstract 16878.
- Beneski, D. A. & Catterall, W. A. (1980) Covalent labeling of protein components of the sodium channel with a photoactivable derivative of scorpion toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(1), 639-643. <https://www.pnas.org/doi/epdf/10.1073/pnas.77.1.639>
- Benzinger, G. R., Tonkovich, G. S., & Hanck, D. A. (1999). Augmentation of recovery from inactivation by site-3 Na channel toxins: A single-channel and whole-cell study of persistent currents. *The Journal of General Physiology*, 113(2)333-346. <https://doi.org/10.1085/jgp.113.2.333>
- Bertipaglia, I., & Carafoli, E. (2007). Chapter 2: Calpains and human disease. In M. Carafoli, E; Brini (Ed.), *Calcium signalling and disease. Molecular Pathology of Calcium*. (pp. 29–53). Springer. <https://link.springer.com/book/10.1007%2F978-1-4020-6191-2>
- Bi, R. Y., Meng, Z., Zhang, P., Wang, X. D., Ding, Y., & Gan, Y. H. (2017). Estradiol upregulates voltage-gated sodium channel 1.7 in trigeminal ganglion contributing to hyperalgesia of inflamed TMJ. *PLoS ONE*, 12(6), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178589>
- Bondada, V., Gal, J., Mashburn, C., Rodgers, D. W., Larochelle, K. E., Croall, D. E., & Geddes, J. W. (2021). The C2 domain of calpain 5 contributes to enzyme activation and membrane localization. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1868(7), 119019. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.119019>
- Brocard, C., Plantier, V., Boulenguez, P., Liabeuf, S., Bouhadfane, M., Viallat-Lieutaud, A., Vinay, L., & Brocard, F. (2016). Cleavage of Na⁺ channels by calpain increases persistent Na⁺ current and promotes spasticity after spinal cord injury. *Nature Medicine*, 22(4), 404–411. <https://doi.org/10.1038/nm.4061>
- Camins, A., Verdaguer, E., Folch, J., & Pallàs, M. (2006). Involvement of calpain activation in neurodegenerative processes. *CNS Drug Reviews*, 12(2), 135–148. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2006.00135.x>
- Catterall, W. A. (2000). From ionic currents to molecular review mechanisms: The structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 26, 13–25. [https://www.cell.com/neuron/pdf/S0896-6273\(00\)81133-2.pdf](https://www.cell.com/neuron/pdf/S0896-6273(00)81133-2.pdf)

Catterall, William A. (2010). Signaling complexes of voltage-gated sodium and calcium channels. *Neuroscience Letters*, 486(2), 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.08.085>

Catterall, W. A. (2014). Structure and function of voltage-gated sodium channels at atomic resolution. *Experimental Physiology*, 99 (1), 35-51. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.071969>

Catterall, W. A. (2015). Voltage-gated sodium channels. In Z. Jie & M. C. Trudeau (Eds.), *Handbook of Ion Channels* (1st ed., pp. 213–226). CRC Press. <https://www-taylorfrancis-com.pbidi.unam.mx:2443/chapters/edit/10.1201/b18027-24/voltage-gated-sodium-channels-william-catterall?context=ubx&refId=f6fb0379-a357-415f-8311-44f49d067554>

Catterall, W. A. (2017). Forty years of sodium channels: Structure, function, pharmacology, and epilepsy. *Neurochemical Research*, 42(9), 2495–2504. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2314-9>

Chowdhury, S. & Chanda, B. (2015) Basic Mechanisms of voltage sensing. In Z. Jie & M. C. Trudeau (Eds.), *Handbook of Ion Channels* (1st ed., pp. 25–39). CRC Press. <https://www-taylorfrancis-com.pbidi.unam.mx:2443/chapters/edit/10.1201/b18027-24/voltage-gated-sodium-channels-william-catterall?context=ubx&refId=f6fb0379-a357-415f-8311-44f49d067554>

Cox, J. J., Reimann, F., Nicholas, A. K., Thornton, G., Roberts, E., Springell, K., Karbani, G., Jafri, H., Mannan, J., Raashid, Y., Al-Gazali, L., Hamamy, H., Valente, E. M., Gorman, S., Williams, R., McHale, D. P., Wood, J. N., Gribble, F. M., & Woods, C. G. (2006). An *SCN9A* channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature*, 444(7121), 894–898. <https://doi.org/10.1038/nature05413>

Cusdin, F. S., Clare, J. J., & Jackson, A. P. (2008). Trafficking and cellular distribution of voltage-gated sodium channels. *Traffic*, 9(1), 17–26. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00673.x>

duVerle, D., Takigawa, I., Ono, Y., Sorimachi, H., Mamitsuka, H. (2010). CaMPDB: a resource for calpain and modulatory proteolysis. *Genome Informatics*. 22 :202-214, doi: 10.1142/9781848165786_0017. Recurso disponible en: <http://calpain.org/predict.rb?cls=substrate>

Ehrig, T., O’Kane, D. J., & Prendergast, F. G. (1995). Green-fluorescent protein mutants with altered fluorescence excitation spectra. *FEBS Letters*, 367(2), 163–166. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00557-P](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00557-P)

Eijkelkamp, N., Linley, J. E., Baker, M. D., Minett, M. S., Cregg, R., Werdehausen, R., Rugiero, F., & Wood, J. N. (2012). Neurological perspectives on voltage-gated sodium channels. *Brain*, 135(9), 2585–2612. <https://doi.org/10.1093/brain/aws225>

Feldman, E. L., Callaghan, B. C., Pop-Busui, R., Zochodne, D. W., Wright, D. E., Bennett, D. L., Bril, V., Russell, J. W., Viswanathan, V. Diabetic neuropathy. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1): 41, 1-18. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0092-1>

Fertleman, C. R., Baker, M. D., Parker, K. A., Moffatt, S., Elmslie, F. V., Abrahamsen, B., Ostman, J., Klugbauer, N., Wood, J. N., Gardiner, R. M., & Rees, M. (2006). *SCN9A* mutations in paroxysmal extreme pain disorder: allelic variants underlie distinct channel defects and phenotypes. *Neuron*, 52(5), 767–774. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.10.006>

Gardella, E. & Møller, R. S. (2019). Phenotypic and genetic spectrum of *SCN8A*-related disorders, treatment options, and outcomes. *Epilepsia*. Suppl 3: S77-S85. <https://doi.org/10.1111/epi.16319>

Gao, N., Lu, M., Echeverri, F., Laita, B., Kalabat, D., Williams, M. E., Hevezi, P., Zlotnik, A., Moyer, B. D. (2009). Voltage-gated sodium channels in taste bud cells. *BMC Neuroscience*, 10 (20). <https://doi.org/10.1186/1471-2202-10-20>

Goll, D. E., Thomson, V. F., Taylor, R., & Zalewska, T. (1992). Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin? *BioEssays*, 14(8), 549-556. <https://doi.org/10.1002/bies.950140810>

Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W., & Cong, J. (2003). The calpain system. *Physiological Reviews*, 83(3), 731–801. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2002>

Grubinska, B., Chen, L., Alsaloum, M., Rampal, N., Matson, D., Yang, C., Taborn, K., Zhang, M., Youngblood, B., Liu, D., Galbreath, E., Allred, S., Lepherd, M., Ferrando, R., Kornecook, T., Lehto, S., Waxman, S., Moyer, B., Dib-Hajj, S., & Gingras, J. (2019). Rat Nav1.7 loss-of-function genetic model: Deficient nociceptive and neuropathic pain behavior with retained olfactory function and intra-epidermal nerve fibers. *Molecular Pain*, 15: 1–23. <https://doi.org/10.1177/1744806919881846>

Han, C., Rush, A. M., Dib-Hajj, S. D., Li, S., Xu, Z., Wang, Y., Tyrrell, L., Wang, X., Yang, Y., & Waxman, S. G. (2006). Sporadic onset of erythralgia: A gain-of-function mutation in Na v1.7. *Annals of Neurology*, 59(3), 553–558. <https://doi.org/10.1002/ana.20776>

Hille, B. (2001). Introduction. In *Ion channels of excitable membranes* (Tercera edición, pp. 1–22). Sinauer Associates, Inc. https://doi.org/10.1007/3-540-29623-9_5640

Hirsh, J. K., & Quandt, F. N. (1996). Down-regulation of Na channel expression by A23187 in N1E-115 neuroblastoma cells. *Brain Research*, 706(2), 343–346. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01340-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01340-7)

Hoffmann, T., Sharon, O., Wittmann, J., Carr, R. W., Vyshnevskaya, A., Col, R. De, Nassar, M. A., Reeh, P. W., & Weidner, C. (2018). Nav1.7 and pain. *Pain*, 159(3), 496-506. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001119>

Hong, S., Morrow, T. J., Paulson, P. E., Isom, L. L., & Wiley, J. W. (2004). Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in tetrodotoxin-sensitive and -resistant sodium channels in dorsal root ganglion neurons in the rat. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(28), 29341–29350. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404167200>

Horikawa, Y., Oda, N., Cox, N. J., Li, X., Orho-Melander, M., Hara, M., Hinokio, Y., Lindner, T. H., Mashima, H., Schwarz, P. E. H., Del Bosque-Plata, L., Horikawa, Y., Oda, Y., Yoshiuchi, I., Colilla, S., Polonsky, K. S., Wei, S., Concannon, P., Iwasaki, N., Schulze, J., Baier, L., Bogardus, C., Groop, L., Boerwinkle, E., Hanis, C. L., Bell, G. I. (2000). Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature Genetics*, 26(2), 163–175. <https://doi.org/10.1038/79876>

Ho C, O'Leary ME. (2010). Single-cell analysis of sodium channel expression in dorsal root ganglion neurons. *Mol Cell Neurosci*. 2011 Jan;46(1):159-66. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.08.017>

Hosfield, C. M., Elce, J. S., Davies, P. L., & Jia, Z. (1999). Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca²⁺-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation Christopher. *EMBO Journal*, 18(24), 6880–6889. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.24.6880>

Huang, Y., & Wang, K. K. W. (2001). The calpain family and human disease. *Trends in Molecular Medicine*, 7(8), 355–362. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(01\)02049-4](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(01)02049-4)

Jette, N., Coderre, E., Nikolaeva, M. A., Enright, P. D., Iwata, A., Smith, D. H., Jiang, Q., & Stys, P. K. (2006). Spatiotemporal distribution of spectrin breakdown products induced by anoxia in adult rat optic nerve *in vitro*. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 26(6), 777–786. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600226>

Jo, S., & Bean, B. P. (2011). Inhibition of neuronal voltage-gated sodium channels by Brilliant blue G. *Molecular Pharmacology*, 80(2), 247–257. <https://doi.org/10.1124/mol.110.070276>

- Kharatmal, S. B., Singh, J. N., & Sharma, S. S. (2015). Calpain inhibitor, MDL 28170 confer electrophysiological, nociceptive and biochemical improvement in diabetic neuropathy. *Neuropharmacology*, 97(6), 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.05.040>
- Kingwell, K. (2019). Nav1.7 withholds its pain potential. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7–9. <https://doi.org/10.1038/d41573-019-00065-0>
- Larsen, A. K., De Veyra, T., Jia, Z., Wells, A., Dutt, P., & Elce, J. S. (2004). Expression of human, mouse, and rat m-calpains in *Escherichia coli* and in murine fibroblasts. *Protein Expression and Purification*, 33(2), 246–255. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2003.10.005>
- Leterrier, C., Brachet, A., Fache, M. P., & Dargent, B. (2010). Voltage-gated sodium channel organization in neurons: Protein interactions and trafficking pathways. *Neuroscience Letters*, 486(2), 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.08.079>
- Liu, J., Liu, M. C., & Wang, K. K. W. (2008). Calpain in the cns: From synaptic function to neurotoxicity. *Science Signaling*, 1(14), 1–8. <https://doi.org/10.1126/stke.114re1>
- Liu, Z., Cao, J., Gao, X., Ma, Q., Ren, J., & Xue, Y. (2011). GPS-CCD: A novel computational program for the prediction of calpain cleavage sites. *PLoS ONE*, 6(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019001>. Recurso disponible en: <http://ccd.biocuckoo.org/down.php>
- Longo, P. A. (2012). Transient mammalian cell transfection with PEI. *Changes*, 29(6), 997–1003. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00018-5>
- Ma, M. (2013). Role of calpains in the injury-induced dysfunction and degeneration of the mammalian axon. *Neurobiology of Disease*, 60 (December), 61–79. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.08.010>
- Mahajan, V. B., Skeie, J. M., Bassuk, A. G., Fingert, J. H., Braun, T. A., Daggett, H. T., Folk, J. C., Sheffield, V. C., & Stone, E. M. (2012). Calpain-5 mutations cause autoimmune uveitis, retinal neovascularization, and photoreceptor degeneration. *PLoS Genetics*, 8(10), 2–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003001>
- McCartney, C. S. E., & Davies, P. L. (2019). Bacterial expression and purification of calpains. *Methods in Molecular Biology*, 1915, 13–27. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8988-1_2
- Minor, D. L. (2010). Chapter 30: An overview of ion channel structure. In Bradshaw, R. A. & Dennis, E. A. (Ed.), *Handbook of cell signaling*. Second Edition, Vol. 1, pp. 201-207, Academic Press, Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374145-5.00030-9>

Mugita, N., Kimura, Y., Ogawa, M., Saya, H., & Nakao, M. (1997). Identification of a novel, tissue-specific calpain htra-3; a human homologue of the *Caenorhabditis elegans* sex determination gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 239(3), 845–850.

<https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7571>

Nixon, R. A. (2003). The calpains in aging and aging-related diseases. *Ageing Research Reviews*, 2(4), 407–418. [https://doi.org/10.1016/S1568-1637\(03\)00029-1](https://doi.org/10.1016/S1568-1637(03)00029-1)

Ono, Y., & Sorimachi, H. (2012). Calpains - An elaborate proteolytic system. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1824(1), 224–236.

<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.08.005>

Ono, Y., Saido, T. C., & Sorimachi, H. (2016) Calpain research for drug discovery: Challenges and potential. *Nature Reviews Drug Discovery* 15(December), 854–876 (2016).

<https://doi.org/10.1038/nrd.2016.212>

Park, J. W., & Rhee, Y. M. (2012). Interpolated mechanics-molecular mechanics study of internal rotation dynamics of the chromophore unit in blue fluorescent protein and its variants. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(36), 11137–11147. <https://doi.org/10.1021/jp306257t>

Rami, A., Agarwal, R., Botez, G., & Winckler, J. (2000). μ -Calpain activation, DNA fragmentation, and synergistic effects of caspase and calpain inhibitors in protecting hippocampal neurons from ischemic damage. *Brain Research*, 866(1–2), 299–312. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02301-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02301-5)

Raschmanová, H., Paulová, L., Branská, B., Knejzlík, Z., Melzoch, K., & Kovar, K. (2018). Production and cleavage of a fusion protein of porcine trypsinogen and enhanced green fluorescent protein (EGFP) in *Pichia pastoris*. *Folia Microbiologica*, 63(6), 773–787.

<https://doi.org/10.1007/s12223-018-0619-y>

Richelson, E. (1973). Regulation of tyrosine hydroxylase activity in mouse neuroblastoma clone N1E-115. *Journal of Neurochemistry*, 21(5), 1139–1145. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1973.tb07568.x>

Romey, G., Chicheportiche, R., Lazdunski, M., Rochat, H., Miranda, F., & Lissitzky, S. (1975). Scorpion neurotoxin — A presynaptic toxin which affects both Na⁺ and K⁺ channels in axons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 64(1), 115–121.

[https://doi.org/10.1016/0006-291X\(75\)90226-0](https://doi.org/10.1016/0006-291X(75)90226-0)

- Saatman, K. E., Creed, J., & Raghupathi, R. (2010). Calpain as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*, 7(1), 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2009.11.002>
- Schaefer, K. A., Toral, M. A., Velez, G., Cox, A. J., Baker, S. A., Borcharding, N. C., Colgan, D. F., Bondada, V., Mashburn, C. B., Yu, C. G., Geddes, J. W., Tsang, S. H., Bassuk, A. G., & Mahajan, V. B. (2016). Calpain-5 expression in the retina localizes to photoreceptor synapses. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 57(6), 2509–2521. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-18680>
- Schaefer, K., Mahajan, M., Gore, A., Tsang, S. H., Bassuk, A. G., & Mahajan, V. B. (2017). Calpain-5 gene expression in the mouse eye and brain. *BMC Research Notes*, 10(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2927-8>
- Schoch, K. M., Evans, H. N., Brelsfoard, J. M., Madathil, S. K., Takano, J., Saido, T. C., & Saatman, K. E. (2012). Calpastatin overexpression limits calpain-mediated proteolysis and behavioral deficits following traumatic brain injury. *Experimental Neurology*, 236(2), 371–382. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.04.022>
- Schoch, K. M., Von Reyn, C. R., Bian, J., Telling, G. C., Meaney, D. F., & Saatman, K. E. (2013). Brain injury-induced proteolysis is reduced in a novel calpastatin- overexpressing transgenic mouse. *Journal of Neurochemistry*, 125(6), 909–920. <https://doi.org/10.1111/jnc.12144>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis". *Nature Methods* 9, 671-675. <https://www.nature.com/articles/nmeth.2089>
- Singh, R., Brewer, M. K., Mashburn, C. B., Lou, D., Bondada, V., Graham, B., & Geddes, J. W. (2014). Calpain 5 is highly expressed in the central nervous system (CNS), carries dual nuclear localization signals, and is associated with nuclear promyelocytic leukemia protein bodies. *Journal of Biological Chemistry*, 289(28), 19383–19394. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.575159>
- Sloan, G., Shillo, P., Selvarajah, D., Wu, J., Wilkinson, I. D., Tracey, I., Anand, P., & Tesfaye, S. (2018). A new look at painful diabetic neuropathy. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 144, 177–191. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.08.020>
- Sorimachi, H., Ishiura, S., & Suzuki, K. (1993). A novel tissue-specific calpain species expressed predominantly in the stomach comprises two alternative splicing products with and without Ca²⁺-binding domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(26), 19476–19482. [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)36540-8/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)36540-8/pdf)
- Srinivasan, J., Schachner, M., & Catterall, W. A. (1998). Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the U.S.A., 95(26), 15753–15757.

<https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15753>

Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y., & Sorimachi, H. (2004). Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes*, 53(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.2007.s12>

Syntichaki, P., Xu, K., Driscoll, M., & Tavernarakis, N. (2002). Specific aspartyl and calpain proteases are required for neurodegeneration in *C. elegans*. *Nature*, 419(6910), 939–944.

<https://doi.org/10.1038/nature01108>

The UniProt Consortium, UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. (2021). *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D480–D489. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>

Veeramah, K. R., O'Brien, J. E., Meisler, M. H., Cheng, X., Dib-Hajj, S. D., Waxman, S. G., Talwar, D., Girirajan, S., Eichler, E. E., Restifo, L. L., Erickson, R. P. & Hammer, M. F. (2012). De novo pathogenic *SCN8A* mutation identified by whole-genome sequencing of a family quartet affected by infantile epileptic encephalopathy and SUDEP. *American Journal of Human Genetics*, 90(3): 502-10. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.01.006>

Veeramah, K. R., Johnstone, L., Karafet, T. M, Wolf, D., Sprissler, R., Salogiannis, J., Barth-Maron, A., Greenberg, M. E., Stuhlmann, T., Weinert, S., Jentsch, T. J., Pazzi, M., Restifo, L. L., Talwar, D., Erickson, R. P., Hammer, M. F. (2013). Exome sequencing reveals new causal mutations in children with epileptic encephalopathies. *Epilepsia*, 54(7): 1270-81. doi:

<https://doi.org/10.1111/epi.12201>

Velez, G., Sun, Y. J., Khan, S., Yang, J., Herrmann, J., Chemudupati, T., MacLaren, R. E., Gakhar, L., Wakatsuki, S., Bassuk, A. G., & Mahajan, V. B. (2020). Structural insights into the unique activation mechanisms of a non-classical calpain and its disease-causing variants. *Cell Reports*, 30(3): 881-892.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.12.077>

Verdaguer, E., Alvira, D., Jiménez, A., Rimbau, V., Camins, A., Pallàs, M. (2005). Inhibition of the cdk5/MEF2 pathway is involved in the antiapoptotic properties of calpain inhibitors in cerebellar neurons. *British Journal of Pharmacology*, 145(8): 1103-11. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706280>

Verspurten, J., Gevaert, K., Declercq, W., Vandenabeele, P. (2009). SitePredicting the cleavage of proteinase substrates. *Trends Biochem Sci.* 34(7): 319-23. doi: 10.1016/j.tibs.2009.04.001.

Recurso disponible en: <https://www.dnbr.ugent.be/prx/bioit2-public/SitePrediction/index.php>

Von Reyn, C. R., Spaethling, J. M., Mesfin, M. N., Ma, M., Neumar, R. W., Smith, D. H., Siman, R., & Meaney, D. F. (2009). Calpain mediates proteolysis of the voltage-gated sodium channel α -

subunit. *Journal of Neuroscience*, 29(33), 10350–10356.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2339-09.2009>

Von Reyn, C. R., Mott, R. E., Siman, R., Smith, D. H., & Meaney, D. F. (2012). Mechanisms of calpain mediated proteolysis of voltage gated sodium channel α -subunits following *in vitro* dynamic stretch injury. *Journal of Neurochemistry*, 121(5), 793–805.

<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07735.x>

Vosler, P. S., Brennan, C. S., & Chen, J. (2008). Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. *Molecular Neurobiology*, 38(1), 78–100.

<https://doi.org/10.1007/s12035-008-8036-x>

Waghray, A., Wang, D. S., McKinsey, D., Hayes, R. L., & Wang, K. K. W. (2004). Molecular cloning and characterization of rat and human calpain-5. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324(1), 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.012>

Wang, J., Ou, S. W., & Wang, Y. J. (2017). Distribution and function of voltage-gated sodium channels in the nervous system. *Channels*, 11(6), 534–554.

<https://doi.org/10.1080/19336950.2017.1380758>

Wang, Y., Lopez, D., Davey, P. G., Cameron, D. J., Nguyen, K., Tran, J., Marquez, E., Liu, Y., Bi, X., & Baudry, M. (2016). Calpain-1 and calpain-2 play opposite roles in retinal ganglion cell degeneration induced by retinal ischemia/reperfusion injury. *Neurobiology of Disease*, 93, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.05.007>

Warr, A., Robert, C., Hume, D., Archibald, A., Deeb, N., & Watson, M. (2015). Exome sequencing: Current and future perspectives. *G3 (Bethesda, Md.)*, 5(8), 1543–1550.

<https://doi.org/10.1534/g3.115.018564>

Waxman, S. G., Kocsis, J. D. & Black, J. A. (1994). Type III sodium channel mRNA is expressed in embryonic but not adult spinal sensory neurons, and is reexpressed following axotomy. *Journal of Neurophysiology*, 72(1), 466-470. [https://doi-](https://doi.org.pbidi.unam.mx:2443/10.1152/jn.1994.72.1.466)

[org.pbidi.unam.mx:2443/10.1152/jn.1994.72.1.466](https://doi.org.pbidi.unam.mx:2443/10.1152/jn.1994.72.1.466)

Waxman, S. G. (2006). A channel sets the gain on pain. *Nature*, 444, 831–832.

<https://doi.org/10.1038/444831a>

Waxman, S. G. (2007). Channel, neuronal and clinical function in sodium channelopathies: From genotype to phenotype. *Nature Neuroscience*, 10(4), 405–409. <https://doi.org/10.1038/nn1857>

- Weber, J. J., Pereira Sena, P., Singer, E., & Nguyen, H. P. (2019). Killing two angry birds with one stone: Autophagy activation by inhibiting calpains in neurodegenerative diseases and beyond. *BioMed Research International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4741252>
- Wert, K. J., Skeie, J. M., Bassuk, A. G., Olivier, A. K., Tsang, S. H., & Mahajan, V. B. (2014). Functional validation of a human CAPN5 exon variant by lentiviral transduction into mouse retina. *Human Molecular Genetics*, 23(10), 2665–2677. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt661>
- Windelborn, J. A., Lipton, P. (2008) Lysosomal release of cathepsins causes ischemic damage in the rat hippocampal slice and depends on NMDA-mediated calcium influx, arachidonic acid metabolism, and free radical production. *Journal of Neurochemistry*, 106(1): 56-69. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05349.x>
- Xue, Y., Chidiac, C., Herault, Y., & Gaariaux-Ruff, C. (2021) Pain behavior in *SCN9A* (Nav1.7) and *SCN10A* (Nav1.8) mutant rodent models. *Neuroscience Letters*, 753 (March). <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135844>
- Yang, S., Zhou, X., Li, R., Fu, X., & Sun, P. (2017). Optimized PEI-based transfection method for transient transfection and lentiviral production. *Current Protocols in Chemical Biology*, 9(3), 147–157. <https://doi.org/10.1002/cpch.25>
- Zhang, A. H., Sharma, G., Undheim, E. A. B., Jia, X., & Mobli, M. (2018). A complicated complex: Ion channels, voltage sensing, cell membranes and peptide inhibitors. *Neuroscience Letters*, 679(April), 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.04.030>