

**Universidad Autónoma Metropolitana: Unidad
Xochimilco**

Hospital General Dr. Manuel Gea González

Dirección de Enseñanza e Investigación

Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad



Título del Proyecto

**Identificación del dominio estructural de α 1-sintrofina
responsable de la interacción con el canal Cav2.1**

Reporte final de actividades

Servicio Social en Investigación (Licenciatura en Medicina)

P R E S E N T A

Alumno: Sebastián Manuel De La Rosa Fernández

Tutora Externa: Dra. Margarita Leyva Leyva

Tutor Interno: Pablo Francisco Oliva Sánchez

Febrero 2, 2026

Índice

Índice	2
Resumen del Informe:	3
Introducción	3
Marco Teórico	5
Antecedentes Generales	5
Antecedentes Específicos: Antecedentes en la interacción entre los canales iónicos y componentes del DGC	6
Justificación	7
Justificación	8
Pregunta de Investigación	8
Hipótesis	8
Objetivo del Protocolo de Investigación	8
Objetivo realizado por el alumno:	8
Objetivos secundarios realizados por el alumno:	9
Material y Métodos	9
Tipo de Investigación:	9
Características de Diseño:	9
Metodología	9
Variables Independientes.....	9
Variable Dependiente.....	9
Procedimientos	10
Western Blot	10
Ensayo de Inmunoprecipitación	10
Informe Numérico Narrativo de las Actividades Realizadas	11
Resultados	11
Conclusiones	16
Anexos	18
Bibliografía	21

Resumen del Informe:

El complejo similar a la distrofina (DGC por sus siglas en inglés) es un complejo esencial necesario para mantener la estructura física celular, al comunicar la matriz extracelular con el medio intracelular. Dentro del complejo intracelular del DGC, se encuentra la α 1-sintrofina, proteína de la cual se conocen 5 isoformas, las cuáles con tejido dependiente y se expresan de manera selectiva dependiendo del estado del desarrollo tisular. Esta proteína se ha demostrado que interacciona físicamente con diferentes canales iónicos, en donde mutaciones puntuales de la misma, se asocia a una regulación a la baja del tránsito de los canales hacia la superficie celular, así como una disfunción en las propiedades bioeléctricas del canal, por lo que una disfunción de la α 1-sintrofina, se asocia a patologías a nivel del sistema nervioso central. El tema principal de este protocolo es dilucidar la interacción física entre la α 1-sintrofina y el canal de calcio dependiente de voltaje 2.1 (Ca_v2.1), que es el principal canal de calcio dependiente de voltaje que se expresa en el cerebro y en el sistema nervioso central. Dentro del año de servicio social, se logró la estandarización de condiciones en las técnicas de biología molecular, principalmente, la extracción de proteínas provenientes de ratones hembra y en las técnicas de Western Blot y los primeros experimentos para estandarizar la inmunoprecipitación del complejo CaV2.1-la α 1-sintrofina.

Introducción

La α 1-sintrofina (SNTA1) es una proteína que pertenece al grupo de proteínas asociadas al complejo de glucoproteínas similares a la distrofina (DGC por sus siglas en inglés), son un grupo heterogéneo de proteínas cuya función más caracterizada es la unión entre la matriz

extracelular con el medio intracelular, donde se le ha atribuido funciones en la homeostasis celular (Ejemplo: mantenimiento y maduración de la sinapsis neuromuscular).¹

La α 1-sintrofina forma parte del complejo proteico que se encuentra en el medio intracelular, la cual cuenta con cinco isoformas producidas por diferentes genes (*SNTA1*, *SNTB1*, *SNTB2*, *SNTG1* y *SNTG2*) cuya expresión es tejido-dependiente, dependerá del estadio del desarrollo celular y su localización subcelular². Entre los dominios más importantes de las sintrofinas es el dominio homólogo a la pleckstrina (PH2) que se une con el dominio carboxilo único de sintrofina (SU), ya que formará una unidad funcional crítica para la unión a distrofina y las subunidades PH1 y el dominio PDZ quedarán libres para la interacción con otras moléculas y generar complejos multiproteicos^{2,3}

Se ha descrito en la literatura la interacción entre canales iónicos y el complejo (DGC) especialmente con el canal de sodio $\text{Na}_v1.5$ que se expresa en el tejido de conducción cardiaco, donde el dominio C de dicho canal interacciona con el dominio PDZ de la sintrofina^{4,5}. En el experimento realizado por Gavillet y colaboradores⁵ encontraron que una mutación de pérdida de función en el dominio PDZ se asociaba a una disminución del 50% del número de canales de sodio tipo $\text{Na}_v1.5$ sin cambios en la concentración del RNAm que codifica para dicho canal. Dicha relación también lo describe Matamoros y colaboradores⁴ donde describen la relación directamente proporcional entre la expresión de α -1 sintrofina y una disminución en la densidad del canal de potasio rectificador de entrada (y de su respectiva corriente) $I_{\text{Kir}2.1}$. Por lo que la función de la de α 1-sintrofina se asocia a la función de canales iónicos que son de vital importancia para la función celular.

Los canales de calcio son la principal forma de entrada de los iones calcio hacia el interior de las células, las cuales tienen dos formas de entrada: a través de canales de calcio dependiente de ligando y canales de calcio dependientes de voltaje. La regulación del calcio es importante para la función celular, ya que el calcio tiene función como segundo mensajero al interior de la célula, la cual puede desencadenar: Liberación de hormonas y neurotransmisores, transcripción de genes, contracción muscular y la secreción hormonal.^{2,6}

Los canales de calcio dependientes de voltaje son complejos multiprotéicos formados por diferentes subunidades: una subunidad central α que atraviesa la membrana y se subdivide en tres clases, según la secuencia de sus aminoácidos y dos subunidades auxiliares, $\text{Ca}_v\beta$, $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ (la subunidad $\text{Ca}_v\gamma$ es inconstante y su expresión es tejido dependiente, encontrándose mayormente en el tejido musculoesquelético).⁶

A nivel neuronal, el canal $\text{Ca}_v2.1$ (tipo P/Q) es el principal canal de calcio asociado a la liberación de neurotransmisores desde las terminales presinápticas. La interacción de este

canal y sus subunidades con la α -1sintrofina y la isoforma de la distrofina Dp140 confiere un cambio en la actividad del canal $Ca_v2.1$ (especialmente con las subunidades $Ca_v\beta_{4e}$ y $Ca_v\alpha_2\delta-1$) lo cual, la interacción entre estos tres elementos confiere mayor vida media al canal de calcio, y por tanto, mayor estabilidad.⁷ Sin embargo, actualmente no se conoce con detalle la interacción entre la α -1sintrofina y el canal de calcio $Ca_v2.1$. la importancia de dicha descripción es que se ha asociado diferentes mutaciones en el canal de calcio con diferentes patologías neurológicas y psiquiátricas.⁸

Marco Teórico

Antecedentes Generales

La distrofina es una proteína del citoesqueleto, localizada en la membrana celular, la cual se encuentra estrechamente relacionada con un grupo de glicoproteínas denominadas “complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina” que se encuentran en la membrana celular, donde también se incluye a la α 1-sintrofina, la cual es una molécula citoplasmática cuya función más reportada es la de mediar entre el medio extracelular con el intracelular.² De tal manera que la α 1-sintrofina funciona como un puente entre los α y β -dístroglicano, estos complejos pueden unir varias proteínas de la matriz extracelular, que pueden ser específicas para cada tejido (Ejemplo: perlecan en el tejido musculoesquelético y las neurexinas en las neuronas).⁹

Se han reportados 5 isoformas diferentes de sintrofinas, (α 1-sintrofina, β 1-sintrofina, β 2-sintrofina, γ 1 sintrofina y γ 2 sintrofina) las cuáles presentan una expresión dependiente de tejidos, del estado del desarrollo y en su localización subcelular.⁹ La mayoría de las sintrofinas se pueden presentar como monómeros o como dímeros y presentan: un dominio PDZ, un grupo carboxilo terminal único (SU) y dos dominios homólogos a la plaquestrina (PH2). Estos dominios interaccionan como una unidad y funcionan como sitio de interacción crucial para la capacidad de interacción de la distrofina.¹⁰

La α 1-sintrofina, en su papel como proteína de andamiaje y que tiene un papel en la coordinación de los eventos de señalización son responsables de la agrupación y anclaje de proteínas en lugares celulares específicos (Fig.1). Si bien, estas moléculas no poseen actividad enzimática intrínseca, poseen extremos terminales capaces de interacciones con: proteínas, lípidos, lipoproteínas y glicoproteínas.¹¹

Las sintrofinas, por sí mismas, son un grupo heterogéneo, donde además de estabilizar la membrana, tiene una segunda función al formar complejos de señalización en los cuales se agrupan a una gran variedad de proteínas de señalización como los canales iónicos al

interactuar con el dominio PDZ, presente en las sintrofina, con el extremo C- terminal de la serie consenso E(S/T)XV.¹²

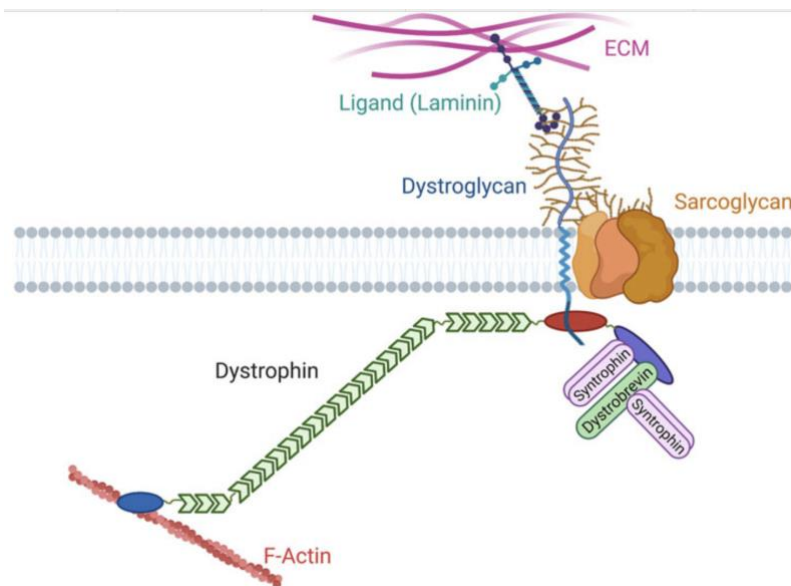


Fig 1. Organización canónica del complejo de glicoproteínas asociados a la distrofina. El distroglicano (azul) es una proteína glicosilada (café) que interactúa con las proteínas de la matriz extracelular que contengan dominios de laminina globular. En su extremo intracelular, interactúa con la distrofina, que contiene un dominio que interactúa con la actina, 24 repeticiones de espectrina (verde) con motivos repetidos de distroglicano (rojo), un dominio (morado) que contiene dos motivos para la unión a las sintrofina (rosa) y un motivo a unión a distrobrevina (verde). (Obtenido de Mirouse, V., 2023)¹³.

Antecedentes Específicos: Antecedentes en la interacción entre los canales iónicos y componentes del DGC.

Los canales iónicos y componentes del DGC pueden interactuar a través de una variedad de proteínas auxiliares que participan en la modulación de las propiedades biofísicas del complejo del canal. Estas proteínas, que forman parte de las subunidades auxiliares de los canales iónicos, modifican las propiedades cinéticas de las corrientes, así como la densidad de canales iónicos que se pueden encontrar en un lugar determinado de la membrana plasmática⁹.

Los canales de calcio mediados por voltaje (Ca_v) se dividen de acuerdo a su umbral de activación de la siguiente manera: bajo umbral de activación (canales tipo T) y los de alto umbral de activación (L-, N-, P/Q y R-) de acuerdo con sus propiedades fisiológicas y farmacológicas. En el grupo de alto umbral de activación, se han descrito como complejos heteromultiméricos conformados por: un complejo formador del poro (subunidad α_1) y las unidades auxiliares del canal (β , $\alpha_2\delta$) y en algunas situaciones puede existir una subunidad gamma γ . Estas subunidades, a su vez, pueden interactuar con diferentes moléculas, incluyendo al citoequeleto⁹,

Un antecedente importante planteado por Gavillet y colaboradores⁴ es la interacción entre la sintrofina y el canal de sodio $\text{Na}_v1.5$, principal canal de sodio expresado en el tejido cardíaco, en donde interacciona la $\alpha1$ -sintrofina con el canal $\text{Nav}1.5$, donde a través de un complejo multiprotéico, donde la expresión de la distrofina y la $\alpha1$ -sintrofina regulan la expresión de dicho canal. Interesantemente, la delección del gen *SNTA1* que codifica para proteína $\alpha1$ -sintrofina, se relaciona con patologías de la conducción intracardiacas como: el síndrome de Brugada.⁴⁻⁵

Adicionalmente, hay evidencia de un complejo proteico específico entre la isoforma de la distrofina Dp140, $\alpha1$ -sintrofina y el canal de calcio dependiente de voltaje $\text{Ca}_v2.1$, que con la interacción subunidades auxiliares $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ y $\text{Ca}_v\beta_{4e}$ aumenta la actividad del canal $\text{Ca}_v2.1$ a través de un mayor número de canales en la membrana que se acompaña de una mayor densidad de corriente.⁷

De igual manera, una desregulación en la función del canal $\text{Ca}_v2.1$ a nivel cerebral, se asocia a disfunción o desregulación de la función neuronal, lo que se traduce en la presencia de epilepsia mioclónica juvenil, desorden bipolar, esquizofrenia, migraña hemipléjica familiar, dolor neuropático y otras entidades neurológicas y psiquiátricas¹⁰.

Debido a la importancia que tienen las sintrofinas y el interactoma que presentan con una gran variedad de moléculas de señalización entre ellas a varios canales iónicos, el motivo de este trabajo de investigación es e identificar el sitio de interacción entre el canal $\text{Ca}_v2.1$ y la $\alpha1$ -sintrofina, así como determinar el mecanismo por el cual $\alpha1$ -sintrofina incrementan la estabilidad de la proteína del canal $\text{Ca}_v2.1$, aumentando el número de canales en la membrana plasmática y, como consecuencia, el incremento en la densidad de la corriente.

Justificación

La interacción entre las diferentes proteínas es crucial para el funcionamiento adecuado de las células y los tejidos, es necesario conocer cuáles son las proteínas claves en estos procesos. $\alpha1$ -sintrofina es una proteína adaptadora involucrada en diversas funciones celulares, determinando a qué proteínas se une y conociendo los dominios estructurales importantes para dichas interacciones, se logrará conocer los mecanismos moleculares que subyacen el proceso de señalización. Esto, con el fin último de relacionar la interacción entre ambas proteínas con la disfunción en el sistema nervioso central.

Justificación

Al conocer la interacción de los canales de calcio dependiente de voltaje $\text{Ca}_v2.1$ con la $\alpha 1$ -sintrofina en un modelo *in vivo*, podremos determinar regiones cruciales donde se llevarían a cabo dichas interacciones y una posible asociación entre mutaciones puntuales en dicho sitio y alteraciones en las propiedades biofísicas del canal, lo que pudiera asociarse a un estado patológico.

Pregunta de Investigación

¿La $\alpha 1$ -sintrofina podría interaccionar directamente con el $\text{Ca}_v2.1$ a través de uno de sus dominios?

Hipótesis

HA: La $\alpha 1$ -sintrofina, a través de alguno de sus dominios es capaz de interaccionar directamente con el canal de calcio dependiente de voltaje $\text{Ca}_v2.1$ o con alguna de sus subunidades.

H0: La $\alpha 1$ -sintrofina, a través de alguno de sus dominios no es capaz de interaccionar directamente con el canal de calcio dependiente de voltaje $\text{Ca}_v2.1$ o con alguna de sus subunidades

Objetivo del Protocolo de Investigación

Identificar qué proteína del complejo del canal $\text{Ca}_v2.1$ interactúa con la $\alpha 1$ -sintrofina mediante la amplificación y expresión de los diversos dominios de la proteína y la realización de mutaciones para investigar estas interacciones mediante ensayos de inmunoprecipitación.

Objetivo realizado por el alumno:

- Estandarizar las condiciones óptimas del ensayo de Western blot de los anticuerpos primarios que reconocen a las proteínas que conforman el complejo del canal de calcio $\text{Ca}_v2.1$

Objetivos secundarios realizados por el alumno:

- Obtención de extractos proteicos a partir de un modelo murino.
- Cuantificar la concentración de proteínas por medio del ensayo del ácido bicinconínico.

Material y Métodos

Tipo de Investigación:

- Experimental

Características de Diseño:

- Estudio Experimental en ciencias básicas *in vitro*.

Metodología

Variables Independientes

Interacción de la α 1-sintrofina con el complejo del canal $Ca_{v2.1}$	Cualitativa Nominal Dicotómica (Sí interacción/ No interacción)
	Se refiere a la asociación de proteínas con el proposito de delucidar su interacción en una perspectiva de señalización de señales; la interacción es cualitativa.

Variable Dependiente

Expresión de las proteínas	Cualitativa Nominal dicotómica (Si hay expresión/ No hay expresión).
	Definición: proceso en la que la activación de un gen produce la generación de un ARNm y un producto protéico final .

Procedimientos

Western Blot

Después de la extracción de proteínas totales, se realizaron alícuotas con una concentración de 50-100µg y proteínas totales. Se utilizó el buffer de Laemmli 2X, calentadas en agua a ebullición durante 5 min y separadas por SDS-PAGE. Después de haber realizado la electroforesis (trans-blot) hacia un papel de nitrocelulosa (Amersham Pharmacia GE Healthcare), las cuáles fueron bloqueados con caseína de grado médico y se incubaron en agitación constante a 4°C durante toda la noche junto con los anticuerpos primarios (Santa Cruz, Anti-Ca_v2.; anti-α1-sintrofina). Posteriormente, se realizaron 3 lavados con Buffer de lavado (Tris-HCl 10 mM pH 7.6, NaCl 15 mM, Tween 20 0.05%) durante 1hr a temperatura ambiente. Posteriormente, se aplica el anticuerpo secundario (Santa Cruz) durante 5 min. Posteriormente, a través de un sistema de luminol 2x (Thermo Fisher) se puso la membrana en un cassette para revelado en una placa de rayos X en un cuarto oscuro y se reveló con un foco rojo y solución de revelado (Kodak).

Ensayo de Inmunoprecipitación

Las proteínas totales se homogenizaron con buffer de inmunoprecipitación (IP) [Tris-HCL: 50mM a un pH 8.0, EDTA 10 mM, Tritón X-100 1%, PMSF 0.5 mM, NaF 10 mM, Na₃VO₄ y una mezcla de inhibidores de proteasas libre de EDTA [complete 2X Roche Applied Science] a 4°C. Las proteínas se cuantificaron con el método del ácido biscodínico. Las proteínas totales se hicieron alícuotas de 1-2 mg, se mezclaron con 30 µg de proteína G agarosa recombinante (Invitrogen) previamente equilibrada con buffer IP conteniendo BSA (albúmina sérica bovina) al 1% como agente bloqueador y se incubó a 4°C en agitación constante durante 2 hrs.

Informe Numérico Narrativo de las Actividades Realizadas

Actividad	Mes calendario programado											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Revisión del protocolo	X	X										
Revisión de manuales del protocolo	X	X	X									
Acreditación de Curso de Metodología de la Investigación en Salud	X	X										
Revisión de literatura de los temas del protocolo	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Capacitación y revisión de la bibliografía para realizar experimentos en biología molecular (PCR, Western Blots y ensayos por inmunoprecipitación)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ejecución de PCR, ampliación y clonación de los dominios estructurales de la α 1-sintrofina, así como realización de Western Blots.						X	X	X	X	X	X	X
Revisión de base de datos	X	X	X	X	X							
Capacitación de base de datos	X	X	X	X	X							
Realizar un trabajo producto del protocolo para el alumno	X									X	X	X
Elaboración de reporte semestral						X	X					
Elaboración de reporte/ trabajo final											X	X

Calendario de actividades. En el siguiente cuadro se describen las actividades realizadas dentro del año de investigación, previamente acordado con la tutora externa, responsable del protocolo ante el Hospital General Dr. Manuel Gea González y ante la Comisión interinstitucional para la Formación de Recursos Humanos en Salud (CIFRHS).

Resultados

1. Obtención de tejido cerebral y de cerebelo en ratones macho de la cepa C57BL/6J.

Se utilizaron dos ratones (*Mus musculus*) machos de la cepa singénica C57BL/6J de 4 a 6 semanas de edad con un peso aproximado de 20 gr, las cuales fueron obtenidos de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Los procesos experimentales realizados con estos modelos se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio”. Así mismo, este modelo murino se encuentra libre de enfermedades infecto-contagiosas o de cualquier otra índole, por lo que no supone un mayor riesgo a la salud de los investigadores.

Para la obtención de tejido cerebral se utilizó la técnica de obtención de cerebro en fresco. Para realizar dicha técnica, previamente se anestesiaron a los ratones con una inyección intraperitoneal de 15 μ l de pentobarbital (dosis letal), una vez que se observa un cese en la actividad motora, se realizó una decorticación manual por tracción cervical. Posteriormente, se decapita el ratón y se realiza disección roma de la bóveda del cráneo

hasta lograr la separación del cerebro de ésta. Se separa el cerebelo del cerebro y se procede a color dichos tejidos en una solución buffer de PBS al 1% en un homogeneizador tipo Dounce, previamente prelavado con una solución de lisis y se generan golpes de pistón hasta obtener una mezcla homogénea. Para su almacenamiento, se colocan las muestras en refrigeración a 4°C para posteriormente ser colocado a -20° C.

2. Extracción de proteínas totales

Las proteínas totales se homogenizaron con buffer de inmunoprecipitación (IP) [Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, Tritón X-100 1%, PMSF 0.5 mM, NaF 10 mM, Na_3VO_4 1 mM y mezcla de inhibidores de proteasas libre de EDTA Complete 2X (Roche Applied Science)] a 4°C. Las proteínas se cuantificaron utilizando el método del ácido bicinonínico. Los extractos proteicos totales se almacenaron con buffer de inmunoprecipitación (IP) [Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, Tritón X-100 1%, PMSF 0.5 mM, NaF 10 mM, Na_3VO_4 1 mM y mezcla de inhibidores de proteasas libre de EDTA Complete 2X (Roche Applied Science)] en alícuotas de 50 µl a -20°C.

3. Cuantificación de proteínas mediante el método del ácido bicinonínico

Preparar por duplicado la curva de proteínas estándar utilizando el stock de BSA a una concentración de 2 mg/ml. Para realizar la cuantificación, se realizan diluciones utilizando agua desionizada de la siguiente manera:

Tubo	6	5	4	3	2	1	0
Concentración BSA (µg/µl)	2000	1000	500	250	125	25	0
Volumen del estándar (µl)	20	20	20 (vial 5)	20 (vial 4)	20 (vial 3)	20 (vial 2)	0
H ₂ O (µl)	0	20	20	20	20	80 *	20

* Después de homogenizar la solución, desechar 80 µl con el fin de tener solamente 20 µl de cada estándar.

2. Se preparó, por duplicado, 20 µl de diluciones 1:20, 1:10 y 1:5 de las muestras de proteínas que se están cuantificando. Utilizar agua desionizada para preparar las diluciones.
3. Se Colocaron 20 µl de cada estándar de proteínas, del blanco y de las diferentes diluciones de las muestras de proteínas en pozos separados de las microplacas.
4. Se preparó el reactivo de bloqueo disolviendo un tubo (20 mg) del reactivo de bloqueo en 1 ml de buffer del reactivo de bloqueo. Mezclar con vórtex durante 30 segundos. Esta cantidad de solución es suficiente para el análisis de 50 muestras (20 µl por muestra). Mantener a temperatura ambiente.
5. Añadir 20 µl de reactivo de bloqueo recién preparado a todos los pozos conteniendo la curva de proteínas estándar, el blanco y las muestras.
6. Mezclar completamente durante 30 segundos.
7. Sellar la placa e incubar a 37°C durante 30 minutos.
8. Preparar el reactivo de trabajo del BCA (50:1), considerando 200 µl por pozo:

Reactivo A: 6,000 µl

Reactivo B: 120 µl

Nota: Al mezclar, se observará una turbidez verde que desaparecerá al continuar mezclando para obtener una solución verde. Mantener el reactivo a temperatura ambiente.

9. Nos aseguramos de que no haya líquido en la tapa de la placa y adicionar 200 µl del reactivo de trabajo del BCA (50:1) a todos los pozos conteniendo la curva de proteínas estándar, el blanco y las muestras.
10. Se mezcló completamente durante 30 segundos.
11. Se selló la placa e incubar a 37°C durante 30 minutos.
12. Después de la incubación, se enfrió la placa a temperatura ambiente y asegurarse de que no haya líquido en la tapa de la placa.
13. Leer la absorbancia a **562 nm**.

Cuantificación de proteínas mediante el método del ácido bicinonínico

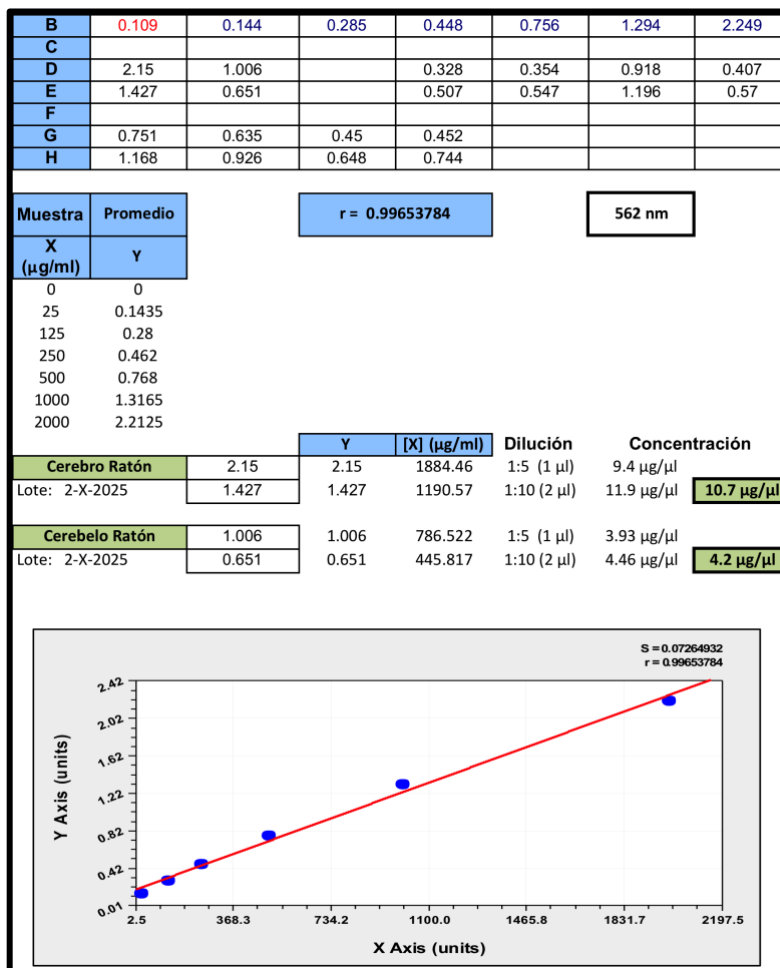


Tabla 1: Estandarización en la extracción de proteínas: en esta table se observa una cuadrícula de la B-H en donde en las filas B-E corresponden a extractos proteínicos de cerebro (por triplicado) y de la F a la H corresponden a extractos proteicos de cerebelo. Se realizó la medición en la absorbancia de las muestras y se promediaron los valores de la absorbancia por triplicado. Se realizó una gráfica con la absorbancia y los gramos de proteínas con correlación con una concentración conocida con proteína albúmina bovina. Se calculó el valor de r^2 de los valores de los extractos y se obtiene un valor de $r=0.99$, por lo que se considera que los valores predichos de concentración se encuentran dentro de la recta.

4. Estandarización del ensayo de Western blot

Se utilizaron los extractos proteicos provenientes del tejido cerebral de los modelos murinos, descritos previamente.

Alícuotas de 50-100 µg de extractos de proteínas totales y proteínas co-inmunoprecipitadas se diluyeron con buffer de muestra Laemmli 2X, calentadas en agua a ebullición durante 5 min y separadas por SDS-PAGE. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas PVDF (Amersham Pharmacia GE Healthcare), las cuales se bloquearon con caseína grado Hammerstein (MP Biomedicals) al 1% en TBS-T (Tris-HCl 10 mM pH 7.6, NaCl 15 mM, Tween 20 0.05%) durante 1 h a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron a 4°C toda la noche en agitación constante con los siguientes anticuerpos primarios diluidos en TBS-T: anti- $\text{Ca}_v2.1$, anti- $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ y anti- $\text{Ca}_v\beta_4$. Después de 3 lavados con TBS-T, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes dependiendo del origen del anticuerpo primario usado: anti-ratón de cabra conjugado a HRP (Horseradish peroxidase) (Zymed) o anti-conejo de cabra conjugado a HRP (Jackson ImmunoResearch) diluidos en TBS-T conteniendo 5% de leche sin grasa. La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 1 h en agitación constante. La detección quimioluminiscente se realizó con el Sistema Immun-Star HRP (Bio-Rad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se expusieron películas autorradiográficas sensibles a quimioluminiscencia (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a la membrana durante diferentes tiempos.

Western blot del canal neuronal $\text{Ca}_v2.1$

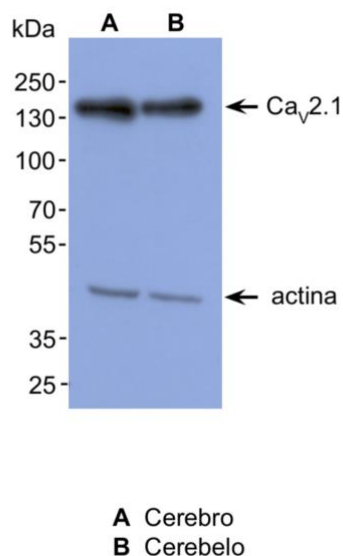


Ilustración 1 Western Blot: Se muestran dos carriles con extractos proteicos extraídos de A: cerebro y B: cerebelo de ratones hembra de 4-8 semanas de edad. Se realizó el Western Blot a un voltaje de 12 mV con los anticuerpos primarios (Alomone) en donde se observa señal en el carril 130 kDa compatible con el peso del canal $\text{Ca}_v2.1$ donde demuestra la estandarización de condiciones para la realización del Western Blot. Como control positivo se utilizó α -actina (Santa Cruz).

Inicialmente se utilizaron geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7.5% de la marca Bio-Rad, en los cuales se cargaron en diferentes pozos alícuotas de extractos proteicos obtenidos de muestras de cerebro y cerebelo obtenidos de modelos murinos. Sin embargo, para las proteínas de mayor peso molecular se decidió utilizar geles al 10% con el fin de obtener una mejor resolución de las proteínas.

Como un primer abordaje, se utilizó un anticuerpo primario contra el canal $Ca_v2.1$ de la marca Santa Cruz a una concentración de 1:500; sin embargo, no se obtuvo una señal específica para la subunidad principal del complejo del canal de calcio, por lo que se decidió realizar un cambio del anticuerpo primario contra la subunidad formadora del poro del canal $Ca_v\alpha_{1A}$ (Alomone ACC-001) a una dilución de 1:2000. Utilizando estas condiciones se obtuvieron los resultados esperados de señal (ilustración 2).

En cuanto al anticuerpo secundario, se utilizó a una concentración que varía desde 1:8000 hasta 1:10,000 dependiendo del origen del anticuerpo primario usado, diluidos en TBS-T. La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 1 h en agitación constante.

Conclusiones

La estandarización de las condiciones para la realización de la técnica de Western blot, constituye un paso importante para la caracterización del complejo del canal de calcio neuronal $Ca_v2.1/Ca_v\alpha_2\delta-1/Ca_v\beta_4$ (tipo P/Q) y la $\alpha 1$ -sintrofina en tejido cerebral y cerebeloso.

La identificación de esta interacción sugiere un posible papel regulador de la $\alpha 1$ -sintrofina sobre los canales de calcio dependientes de voltaje tipo P/Q, no únicamente en su función como canales iónicos, sino también en su modulación a través de proteínas accesorias. Este hallazgo podría contribuir a ampliar el conocimiento sobre los mecanismos mediante los cuales el citoesqueleto participa en la regulación funcional de los canales iónicos, particularmente del canal de calcio tipo P/Q en tejido neuronal.

A lo largo del año de estancia en investigación, adquirí tanto las bases teóricas como la experiencia práctica en la aplicación de técnicas fundamentales de Biología molecular, entre las que destacan la estandarización de condiciones para la extracción de proteínas y la posterior realización de ensayos de Western blot.

Considerando que el proyecto de investigación en el que participé se encontraba en una fase inicial y, debido a la calendarización de actividades y a los procesos de estandarización, no fue posible involucrarme directamente en las etapas de clonación de

los diversos dominios de las proteínas y la realización de mutaciones para investigar las posibles interacciones entre el complejo del canal mediante ensayos de inmunoprecipitación.

Sin embargo, la oportunidad de participar en la etapa inicial del proyecto resultó altamente valiosa para mi formación, ya que esta experiencia me permitió fortalecer habilidades en la planeación experimental, ejecución de protocolos y optimización de técnicas experimentales, aspectos esenciales para la formación en investigación en Biología molecular.

Anexos



Salud
Secretaría de Salud



**La Secretaría de Salud
a través de la Dirección General
de Calidad y Educación en Salud
Otorga el presente**

CONSTANCIA

a

sebastián Manuel De La Rosa Fernández

Por haber concluido satisfactoriamente el Curso a Distancia

**Programa de capacitación en Metodología de la Investigación
en Salud con orientación en Atención Primaria de Salud**

**con una duración de 32 horas,
obteniendo una Calificación de 82.50 %**

Se extiende la presente constancia el 2 May 2025



DRA. MAGDALENA DELGADO BERNAL
Directora de Educación en Salud



Otorga la presente

CONSTANCIA

a

De La Rosa Fernández Sebastián Manuel

Por haber concluido el Servicio Social en Investigación
en el Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad

1° de febrero de 2025 al 31 de enero de 2026

HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ
Ciudad de México • enero de 2026

DRA. LORENA HERNÁNDEZ DELGADO
Directora de Enseñanza
e Investigación

PSIC. A. KARIME ADAME RIVAS
Subdirectora de Enseñanza

DR. RODOLFO VICK FRAGOSO
Jefe de la División de
Enseñanza de Pregrado



Salud
Secretaría de Salud



Salud
Secretaría de Salud

gea
hospital

Hospital General Dr. Manuel Gea González

Dirección de Enseñanza e Investigación
Subdirección de Enseñanza
División de Enseñanza de Pregrado



CONSTANCIA DE TERMINACION DE SERVICIO SOCIAL

Ciudad de México a 31 de enero de 2026

DR. LUIS AMADO AYALA PÉREZ
DIRECTOR
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
UAM XOCHIMILCO
P R E S E N T E

Para los efectos a que hubiera lugar, se hace constar que el (la) C. Alumno (a):

DE LA ROSA FERNANDEZ SEBASTIAN MANUEL

Pasante de Medicina, realizó su Servicio Social Médico en la Modalidad de Investigación, con el proyecto "Identificación del dominio estructural del $\alpha 1$ -sintrofina responsable de la interacción con el canal Cav2.1". Completó satisfactoriamente los objetivos del programa estipulados por la institución, conforme a los lineamientos internos que nos rigen, así como reportes trimestrales y reporte final, en el Departamento de Biología Molecular e histocompatibilidad.

Tutora: **DRA. MARGARITA LEYVA LEYVA**

Con sede en: **HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"**

Durante el periodo del 1° de febrero de 2025 al 31 de enero 2026

A T E N T A M E N T E



HOSPITAL GENERAL
"DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"

EL JEFE DE LA DIVISIÓN
DR. RODOLFO VICK FRAGOSO

DIVISIÓN DE ENSEÑANZA
DE PREGRADO

c.c.p Dr. Pablo Francisco Oliva Sánchez. Asesor Interno de Servicio Social

Salud



2026
Margarita
Maza

Calzada de Tlalpan No. 4800, Col. Belisario Domínguez Sección XVI, CP : 4080, Tlalpan, CDMX
Tel: (55) 4000 3000 Ext 8201 y 8204 www.gob.mx/salud/hospitalgea

Bibliografía

1. **Martínez-Pena y Valenzuela I, Chen PJ, Barden J, et al.** Distinct roles of the dystrophin-glycoprotein complex: α -dystrobrevin and α -syntrophin in the maintenance of the postsynaptic apparatus of the neuromuscular synapse. *Hum Mol Genet.* 2022;31(14):2370-2385. doi:10.1093/hmg/ddac041.
2. **Leyva-Leyva M, Sandoval A, Felix R, González-Ramírez R.** Biochemical and functional interplay between ion channels and the components of the dystrophin-associated glycoprotein complex. *J Membr Biol.* 2018;251(3):343-365. doi:10.1007/s00232-018-0036-9.
3. **Kachinsky AM, Froehner SC, Milgram SL.** A PDZ-containing scaffold related to the dystrophin complex at the basolateral membrane of epithelial cells. *J Cell Biol.* 1999;145(3):391-402. doi:10.1083/jcb.145.3.391.
4. **Gavillet, B., Rougier, J.S., Domenighetti, A.A., Behar, R., Boixel, C., Ruchat, P., Lehr, H.A., Pedrazzini, T. and Abriel, H.** (2006) Cardiac sodium channel Nav1.5 is regulated by a multiprotein complex composed of syntrophins and dystrophin. *Circulation research*, 99, 407-414.
5. **Matamoros M, Pérez-Hernández M, Guerrero-Serna G, Amorós I, Barana A, Núñez M, et al.** Nav1.5 N-terminal domain binding to α 1-syntrophin increases membrane density of human Kir2.1, Kir2.2 and Nav1.5 channels. *Cardiovasc Res.* 2016;110(2):279-90. doi:10.1093/cvr/cvw009.
6. **Felix R, Calderón-Rivera A, Andrade A.** Regulation of high-voltage-activated Ca^{2+} channel function, trafficking, and membrane stability by auxiliary subunits. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal.* 2013;2(5):207-20. doi:10.1002/wmts.93.

7. **Leyva-Leyva M, et al.** Identification of Dp140 and α 1-syntrophin as novel molecular interactors of the neuronal CaV2.1 channel. *Pflugers Arch.* 2023;475:1203-15

8. **Zamponi GW, et al.** The physiology and pharmacology of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev.* 2015;67:821-870.

9. **Leyva-Leyva, M., Sandoval, A., Felix, R., & González-Ramírez, R.** (2018). *Biochemical and functional interplay between ion channels and the components of the dystrophin-associated glycoprotein complex.* **Journal of Membrane Biology**, **251**(4), 535–550. <https://doi.org/10.1007/s00232-018-0036-9>

10. **Muller, C.S., et al.,** 2010. Quantitative proteomics of the Cav2 channel nano-environments in the mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 14950-7.

11. **Nanou, E., Catterall, W.A.,** 2018. Calcium Channels, Synaptic Plasticity, and Neuropsychiatric Disease. *Neuron.* 98, 466-481.

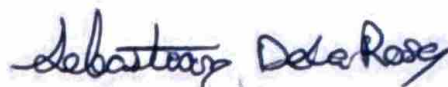
12. **Campbell, K.P., Kahl, S.D.,** 1989. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature.* 338.

13. **Reissner, C., et al.,** 2014. Dystroglycan binding to alpha-neurexin competes with neuroligin-1 and neuroligin in the brain. *J Biol Chem.* 289, 27585-603.

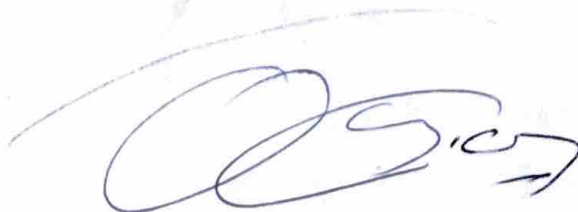
14. **Mirouse V.** Evolution and developmental functions of the dystrophin-associated protein complex: beyond the idea of a muscle-specific cell adhesion complex. *Front Cell Dev Biol.* 2023 Jun 13;11:1182524. doi:10.3389/fcell.2023.1182524.



Dra. Margarita Leyva Leyva
Investigadora en Ciencias Médicas B
Tutora Externa



Sebastián Manuel De La Rosa Fernández
Alumno del Servicio Social en
Medicina



Dr. Pablo Francisco Oliva Sánchez
Departamento de Atención a la Salud
Tutor Interno