

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Sistemas Biológicos
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Título de investigación:

Construcción de la mutación puntual de Arg893His del gen *SCN5A* mediante mutagénesis dirigida en células HEK293

Proyecto genérico:

Evaluación de productos relacionados con la salud

Etapas:

Desarrollo de métodos y técnicas analíticas para el control físico, químico, biológico y/o microbiológico de productos relacionados con la salud

Alumno: Eduardo Pérez Díaz

Matricula: 2173028041

Nombre y clave del programa del servicio social: Investigación científica en Medicina Genómica

Fecha de inicio y término: 07 de marzo del 2022 al 07 de septiembre del 2022

Institución: Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN)



Dr. Eduardo Zúñiga León

No. Económico: 44145

Asesor interno



Dra. Mayra Domínguez Pérez

Cédula profesional: 10907009

Asesor externo

Índice	
1. Introducción	4
2. Marco teórico	5
2.1 Muerte súbita cardiaca	5
2.2 Canalopatías arritmogénicas.....	5
2.3 Potencial de acción	5
2.4 Enfermedades	6
2.4.1 Síndrome de Brugada (SBr)	6
2.4.2 El síndrome QT largo (SQTL).....	6
2.4.3 Disfunción del nodo sinusal (DNS)	7
2.5 SCN5A	7
2.6 Mutación SCN5A R893H.....	8
2.7 Células HEK-293.....	8
3. Justificación	8
4. Objetivos.....	9
4.1 Objetivo general	9
4.2 Objetivos específicos	9
5. Metodología	9
5.1 Diseño de oligos.....	9
5.1.1 Secuenciación Sanger	9
5.1.2 Mutagénesis dirigida	9
5.2 Mutagénesis dirigida	9
5.3 Secuenciación Sanger	12
5.4 Caracterización funcional	13
5.4.1 Cultivo celular	13
5.4.2 Transfección de los plásmidos en células HEK-293	13
5.4.3 Registro electrofisiológico de la corriente I _{Na} (SCN5A y SCN2B).....	13
6. Actividades realizadas	15
7. Objetivos y metas alcanzadas	16
8. Resultados.....	17
8.1 Diseño de oligos.....	17
8.2 Mutagénesis dirigida	18
8.3 Secuenciación Sanger	19

8.4	Caracterización funcional	20
9.	Conclusiones	22
10.	Recomendaciones.....	22
11.	Bibliografía.....	23

1. Introducción

La muerte súbita (MS) representa un grave problema de salud; y es responsable de aproximadamente 300,000 muertes al año, además se estima que causa cerca de 4-5 millones de decesos por año en todo el mundo. La MS se define como la muerte inesperada y no traumática ocurrida en el lapso de una hora en una persona sin signos previos de fatalidad (González *et al.*, 2014; Kline y Constantini, 2019).

Una minoría de estas muertes se produce en individuos jóvenes y sanos; recientes estudios epidemiológicos de muerte súbita cardíaca (MSC) muestran que estas muertes son causadas por una enfermedad cardíaca hereditaria no diagnosticada como las canalopatías. En población adulta en países occidentales, las canalopatías iónicas (1-2 %) se diagnostican en aproximadamente el 75 % de los casos de MSC (Mizusawa, 2020). Las canalopatías arritmogénicas (CA) son un grupo de enfermedades hereditarias con anomalías en la actividad eléctrica en un corazón estructuralmente sano que conducen a arritmias letales y MSC. Las CA se producen debido a mutaciones genéticas que afectan a los canales de sodio (Na^+), potasio (K^+) y calcio (Ca^{2+}), responsables del transporte de iones a través de la membrana celular del miocardio. Si hay una pérdida o una ganancia de función en uno de estos canales iónicos, el potencial de acción se altera de manera que predispone al paciente a arritmias potencialmente mortales (Kline y Constantini, 2019).

El gen de *SCN5A* codifica la subunidad α del canal del sodio cardíaco Nav1.5, el cual es responsable de mantener la función normal de la corriente de entrada de sodio (INa). La INa es el componente principal en la fase de despolarización rápida después de la cual se inicia la cascada de acoplamiento de excitación-contracción y la conducción adecuada del impulso eléctrico dentro del corazón (Li *et al.*, 2018).

El gen *SCN5A* está ubicado en el brazo corto del cromosoma 3 (3p21), contiene 28 exones y codifica para la subunidad α del canal de sodio cardíaco (Nav1.5), que tiene un peso de ~220 kDa y consta de 2016 aminoácidos. La subunidad α de Nav1.5 es formadora del poro del canal Nav1.5 y contiene cuatro dominios transmembrana homólogos (DI a DIV) unidos por tres enlazadores. Cada uno de los dominios consta de seis segmentos transmembrana (S1 a S6) unidos por asas intra o extracelulares. S4 está cargado positivamente y está involucrado en la activación del canal dependiente del voltaje, mientras que la inactivación está mediada principalmente por el enlazador entre DIII y DIV (Zumhagen *et al.*, 2013).

Existen reportes de las variantes de *SCN5A* y su correlación con la disfunción contráctil del miocardio, la miocardiopatía dilatada y la insuficiencia cardíaca. Según la base de datos "ClinVar" muestra que más de 700 ubicaciones de variación de *SCN5A* están asociadas con trastornos cardíacos y alrededor del 90 % de las variantes representan variantes no sinónimas, mientras que el resto se debe a la eliminación y duplicación (Li *et al.*, 2018). Sin embargo, la falta de validación biológica o funcional de los efectos de las mutaciones sigue siendo una limitación importante en la interpretación de las CA, por lo que realizar los estudios funcionales de las mutaciones puede ser de gran utilidad para el tratamiento de las CA.

A la fecha se han identificado varias variantes posiblemente patogénicas en pacientes con diagnóstico de alguna CA. Es por ello que este proyecto pretende evaluar la mutación puntual Arg893His en el gen *SCN5A*, sobre el funcionamiento del canal de sodio cardiaco Nav1.5.

2. Marco teórico

2.1 Muerte súbita cardiaca

La muerte súbita cardiaca (MSC) es la causa más común de muerte en los países occidentales y en Estados Unidos, siendo responsable de 250,000 a 400,000 muertes al año (Cerrone y Priori, 2011; Stecker *et al.*, 2014). La MSC es aquella que se produce de forma repentina e inesperada en la primera hora después de iniciados los síntomas en un individuo que puede o no presentar una historia previa de problemas cardiacos (Myerburg, 2001; Priori *et al.*, 2015).

Una minoría de estas muertes se produce en individuos jóvenes y sanos; recientes estudios epidemiológicos de muerte súbita cardiaca (MSC) muestran que estas muertes son causadas por una enfermedad cardiaca hereditaria no diagnosticada como las canalopatías arritmogénicas (Mizusawa, 2016).

2.2 Canalopatías arritmogénicas

Las canalopatías arritmogénicas son un grupo de síndromes arrítmicos hereditarios causados por mutaciones en los genes que codifican y/o regulan canales iónicos expresados en el corazón (de Na^+ , K^+ y Ca^{2+}), responsables del transporte de iones a través de la membrana celular del miocardio (Kline y Constantini, 2019; Cerrone *et al.*, 2012; Fonseca y Vaz da silva, 2018). Si hay pérdida o ganancia de función en un canal iónico, el potencial de acción cardiaco se altera, lo que da origen a arritmias potencialmente mortales (Kline y Constantini, 2019).

2.3 Potencial de acción

El potencial de acción del miocito cardiaco ventricular se divide en cinco fases (Figura 1) (Behere y Weindling, 2015).

Fase 0: también conocida como fase de despolarización rápida, se caracteriza por la entrada masiva de iones Na^+ a través de los canales Nav1.5 dependientes de voltaje que acarrear la corriente rápida de Na^+ (I_{Na}). Estos canales, como son dependientes de voltaje, se activan cuando la membrana del cardiomiocito se despolariza.

Fase 1: inicia la repolarización temprana por la apertura de los canales de K^+ responsables de la corriente transitoria de salida (I_{to}).

Fase 2: se caracteriza por la presencia de una meseta en el potencial de acción que representa un equilibrio entre dos corrientes de entrada (una de Ca^{2+} y la de Na^+) y una corriente salida de K^+ rápida (I_{Kr}).

Fase 3: se inactivan las corrientes de Na^+ y Ca^{2+} iniciando la repolarización tardía por la salida de iones K^+ a través de diferentes canales iónicos y corrientes, entre ellas la corriente lenta de K^+ (I_{Ks}).

Fase 4: regreso al potencial de reposo por la activación del rectificador de entrada (IKir).

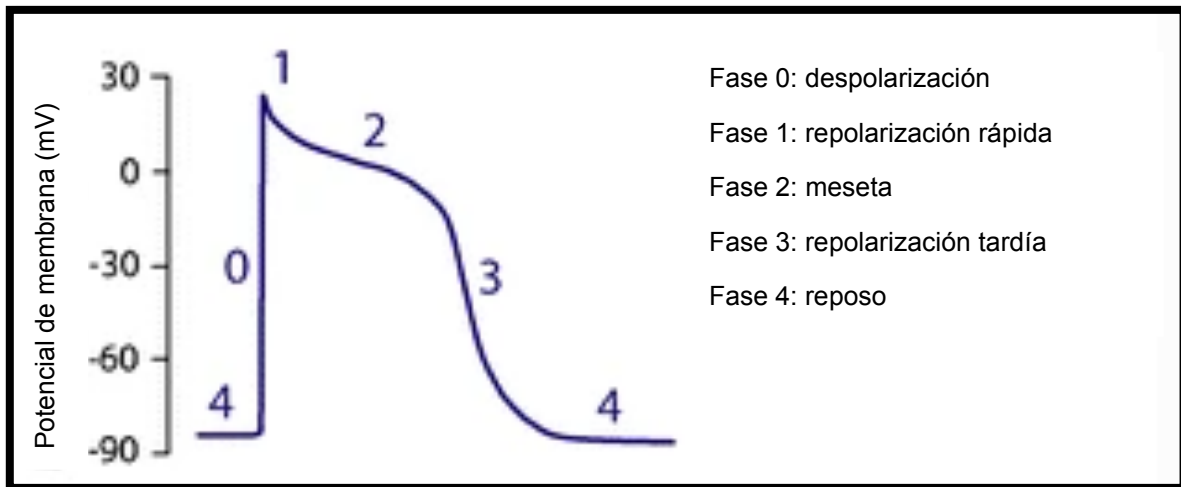


Figura 1. Potencial de acción de miocitos ventriculares (Amin *et al.*, 2010).

2.4 Enfermedades

Las variantes genéticas de *SCN5A* están involucradas en varias canalopatías cardíacas hereditarias, las más frecuentes son síndrome de Brugada (SBr), el síndrome de QT largo tipo 3 (SQTL-3), disfunción del nodo sinusal (DNS) (Li *et al.*, 2018; Amin *et al.*, 2010)

2.4.1 Síndrome de Brugada (SBr)

El SBr se diagnostica en pacientes con alto riesgo de muerte súbita debido a taquicardias ventriculares (taquicardia ventricular polimórfica y fibrilación ventricular), este síndrome es caracterizado por un patrón en el electrocardiograma (ECG), el cual, consiste en una elevación del segmento ST de tipo cóncavo en las derivaciones precordiales derechas V_1 a V_3 (denominado patrón de ECG de Brugada tipo 1) (Kapplinger *et al.*, 2010; Amin *et al.*, 2010; Meregalli *et al.*, 2005).

2.4.2 El síndrome QT largo (SQTL)

El SQTL es una enfermedad arritmogénica hereditaria que se caracteriza por intervalos QT prolongados. Entre las 15 formas actuales de SQTL, el síndrome de QT largo tipo 3 (SQTL-3), causado por variantes hereditarias de *SCN5A* (gen que codifica para la subunidad α de la corriente de Na^+ cardíaca) con un riesgo creciente de muerte súbita durante el reposo o el sueño y se caracteriza en el ECG por un intervalo QT/QTc prolongado, dispersión de QT acentuada, aparición de onda T y una frecuente onda U prominente (Li *et al.*, 2018).

2.4.3 Disfunción del nodo sinusal (DNS)

El DNS es una enfermedad que abarca varias formas de arritmias y se diagnostican mediante un electrocardiograma, el cual, incluye bradicardia sinusal, paro sinusal y respuesta cronotrópica reducida. Los pacientes pueden sufrir síncope y requerir terapia de marcapasos (Li *et al.*, 2018; Amin *et al.*, 2010; Abe *et al.*, 2014).

2.5 SCN5A

Los canales de sodio dependientes de voltaje son complejos proteícos transmembrana, constituídos por una subunidad α conductora de iones que forma poros y subunidades β auxiliares, así como varias proteínas reguladoras (Amin *et al.*, 2010; Abriel y Kass, 2018).

El gen *SCN5A* está ubicado en el brazo corto del cromosoma 3 (3p21), contiene 28 exones y codifica para la subunidad α del canal de sodio cardiaco (Nav1.5), que tiene un peso de ~ 220 kDa y consta de 2016 aminoácidos. El canal de Nav1.5 está compuesto por cuatro dominios transmembrana homólogos (DI a DIV) unidos por tres enlazadores. Cada uno de los dominios consta de seis segmentos transmembrana (S1 a S6) unidos por asas intra y extracelulares. Los segmentos S1 a S4 funcionan como sensor del voltaje; mientras que los cuatro dominios se pliegan entre los segmentos S5 y S6 que constituyen el poro. La expresión y función de Nav1.5 está regulada por subunidades β , las cuales, son proteínas con un extremo N extracelular, un segmento transmembrana y un extremo C citoplasmático (figura 2) (Li *et al.*, 2018; Amin *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2018).

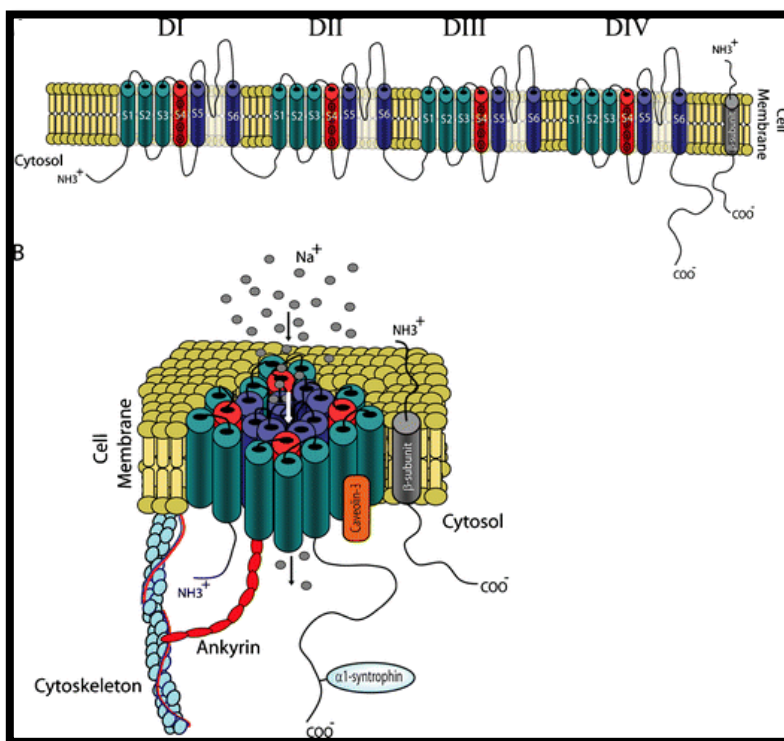


Figura 2. Estructura molecular del canal de sodio cardiaco (Nav1.5) y su subunidad accesoria (Amin *et al.*, 2010).

2.6 Mutación SCN5A R893H

El paciente portador de la mutación sin sentido R893H en el gen *SCN5A* proviene del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Este paciente fue diagnosticado con disfunción del nodo sinusal. En la tabla 1 se muestran algunas características de la mutación.

Tabla 1. Características de la mutación de *SCN5A* R893H.

Mutación	Región	Cambio de nucleótido	Tipo de mutación	Localización en el canal iónico
R893H	Exón 16	2678 G>A	Sin sentido	DII-S5/S6

2.7 Células HEK-293

Las células embrionarias de riñón humano 293 (HEK-293), se utilizan ampliamente como huésped para la expresión heteróloga de proteínas de membrana, especialmente canales iónicos y receptores, ya que presentan una alta eficiencia de transfección, traducción y procesamiento postraducciona. Además de estos atributos, el tamaño celular, morfología, rápida tasa de división, facilidad de mantenimiento y, la baja expresión de canales iónicos endógenos, así como la capacidad de expresar proteínas exógenas con alta fidelidad. Estas características las hacen un modelo experimental idóneo para llevar a cabo estudios estructurales, biofarmacéuticos y aplicaciones de electrofisiología (Ooi *et al.*, 2016).

3. Justificación

Las estrategias de identificación de variantes causales como la secuenciación de nueva generación (NGS) han sido una herramienta de gran utilidad para el diagnóstico molecular de distintas enfermedades, entre ellas canalopatías arritmogénicas. A la fecha, en el laboratorio se han identificado 72 mutaciones en pacientes con canalopatías; de las cuales 44 son patogénicas, 13 no tienen significado y 15 son de significancia desconocida (VUS; del inglés Variant with Unknow/Undefined Significance). Las mutaciones VUS representan un reto para la interpretación de resultados en el ámbito clínico. Para saber su importancia clínica es necesario conocer su impacto en la funcionalidad. Por esto es de gran interés la caracterización funcional de las mutaciones puntuales como Arg893His en el gen *SCN5A* (VUS) para lograr su correcta estratificación y que su interpretación clínica sea de ayuda para el diagnóstico y la identificación de familiares en riesgo.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Construir la mutación puntual Arg893His del gen *SCN5A* del canal de sodio cardiaco Nav1.5.

4.2 Objetivos específicos

1. Construir la mutante Arg893His del gen *SCN5A*.
2. Confirmar la mutante Arg893His del gen *SCN5A* mediante secuenciación Sanger.
3. Expresar el canal Nav1.5 WT y su mutante Arg893His en células HEK-293.
4. Aprender la técnica de *patch-clamp* en su configuración de célula completa para obtener las características biofísicas de las corrientes iónicas.

5. Metodología

5.1 Diseño de oligos

5.1.1 Secuenciación Sanger

Se diseñaron pares de oligonucleótidos (*forward* y *reverse*) para las secuencias de interés, los cuáles fueron adquiridos en el Instituto de Biotecnología (UNAM), se utilizó la aplicación de *Primer Blast*, eligiendo los de menor diferencia en las temperaturas de fusión entre ellos, presentando máxima complementariedad y menor probabilidad de generación de dímeros entre primers.

5.1.2 Mutagénesis dirigida

Se diseñaron pares de oligonucleótidos (*forward* y *reverse*) que contienen el cambio de base de la mutación, para el transcrito humano 1 de *SCN5A* utilizando la plataforma de Agilent (QuikChange Primer Desing). Se sintetizaron con Sigma-Aldrich. Los oligos resultantes fueron: FW 5'-CTTCCTCATCATCTTCCACATCCTCTGTGGAGAGT-3'; RV 5'-ACTCTCCACAGAGGATGTGGAAGTGATGAGGAAG-3'.

5.2 Mutagénesis dirigida

Para la construcción de la mutación de *SCN5A* R893H, se utilizó la técnica mutagénesis sitio-dirigida empleando una polimerasa de alta afinidad, la cual, permite mutar un sitio específico en cualquier plásmido de cadena doble y sintetizar la cadena de ADN con tasa mínima de errores, eliminando la necesidad de subclonar. Esta técnica no requiere de vectores especializados, sitios de restricción únicos, transformaciones múltiples o metilación in vitro.

Para este procedimiento se utilizó el kit QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis de Agilent Technologies. Este kit está optimizado específicamente para la amplificación de constructos largos y permite la construcción de mutaciones sitio-dirigidas en prácticamente cualquier plásmido de doble cadena.

Se utilizó el plásmido conteniendo el cDNA codificante de la subunidad α del canal Nav1.5 de humano clonado en el vector pcDNA, con un tamaño de 11553 pb.

- 1. Reacción de síntesis de hebra mutante (ciclo térmico).** Se emplearon los oligonucleótidos descritos previamente conteniendo la mutación y se siguieron las indicaciones del fabricante. En la tabla 2 se muestran los reactivos empleados para la PCR de mutagénesis dirigida y en la tabla 3 se muestran los ciclos de amplificación utilizados para la síntesis de la mutación SCN5A R893H.

Tabla 2. Reacciones de las muestras para el método QuikChange II XL.

Cantidad (µl)	Reacciones
5	Buffer de reacción 10X
3	Templado (10 ng/µl)
2.5	Primer (Fw) (50 ng/µl)
2.5	Primer (Rv) (50 ng/µl)
1	dNTP
3	QuikSolution
33	H ₂ O para volumen final de 50 µl

Tabla 3. Parámetros de ciclos para el método QuikChange II XL.

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95°C	1 minuto
2	18	95°C	50 segundos
		60°C	50 segundos
		68°C	13 minutos
3	1	68°C	7 minutos

- 2. Digestión de los productos de amplificación con Dpn I.** Se añadió 1 µl de la enzima de restricción Dpn I directamente a la reacción de amplificación. Después se mezcló suavemente la reacción pipeteando la solución de arriba abajo varias veces. Posteriormente se centrifugó la mezcla de reacción en una microcentrífuga y se incubó a 37°C durante 1 hora para digerir el parental, es decir, el no mutado, ADNdc que utilizamos como templado. Luego de la digestión del templado se realizó una electroforesis en gel agarosa al 1.5 % en 40 ml de Buffer TAE 1X, utilizando 2 µl de Buffer de

carga (3X), 2 µl de GelRed y 1 µl de DNA; se aplicó un voltaje de 40 V durante 1.30 h para evaluar la integridad de SCN5A R893H.

- 3. Transformación por choque térmico.** En este paso se transformaron las bacterias competentes con el nuevo plásmido que contenía la mutación. Agregando 10 µl de PCR "SCN5A R893H" a un tubo de bacterias *Escherichia coli* DH5α, se incubó durante 30 min en baño de hielo y posteriormente en un termobloque a 42°C durante 1 min 15 s. Se transfirió rápidamente a baño de hielo durante 2 min. Después se adicionaron 250 µl de caldo LB, se mezcló suavemente y se incubó a 37°C durante 1 hora con agitación. Se sembró una alícuota en una placa de agar LB con ampicilina (antibiótico de selección) y se incubó a 37°C de 18-24 horas. Se seleccionaron colonias aisladas y se sembraron en tubos con caldo de LB + ampicilina y se incubaron a 37°C con agitación durante 18-24 h.

Se empleó el kit QIAprep Spin Miniprep para extraer y purificar el ADN plasmídico. Posterior a esto, se cuantificaron las muestras utilizando el máximo de absorción de ácidos nucleicos a 260 nm y la relación de absorbancias de 260/280 y 260/230 para evaluar la pureza. A 280 nm se absorben contaminantes como compuestos aromáticos, proteínas o presencia de ARN, y para 230 nm se absorben contaminantes como sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos (tabla 4).

Tabla 4. Cuantificación de colonias "SCN5A R893H"

Colonia	[] ng/µl	260/280	260/230
1	246.2	1.86	2.18
2	220.8	1.85	2.11
3	229.1	1.86	2.18
4	257.2	1.85	2.22
5	392.6	1.87	2.19

Para verificar la integridad del ADN plasmídico obtenido del paso anterior se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % en 40 ml de Buffer TAE 1X, utilizando 2 µl de Buffer de carga (3X), 2 µl de GelRed y 1 µl de DNA; se aplicó un voltaje de 40 V durante 1.30 h para evaluar la integridad de cada una de las colonias de SCN5A R893H.

5.3 Secuenciación Sanger

Se secuenciaron las mutantes obtenidas para verificar la presencia de la mutación R893H. Para ello, se empleó el kit comercial BigDye® Direct Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems by Life technologies Foster City, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando los terminadores ddNTP's marcados con el fluorocromo IRDye-800 (tablas 5 y 6).

Tabla 5. Primera reacción en termociclador.

Componente	Volumen (µl)	Fase	9700 thermal cycler	
			Temperatura	Tiempo
Master Mix	5	Hold	96°C	5 min
Oligos FW y RV	1.5 c/u	Ciclos (35 ciclos)	94°C	30 s
DNA	2		62°C	1 min 30 s
Volumen final	10		68°C	45 s
		Hold	72°C	2 min
		Hold	4°C	∞

Tabla 6. Segunda reacción en termociclador.

Componente	Volumen (µl)	Fase	9700 thermal cycler	
			Temperatura	Tiempo
Sequencing Master Mix	2	Hold	37°C	15 min
M13 primer FW	1	Hold	80°C	2 min
DNA	5	Hold	96°C	1 min
Volumen final	8	Ciclos (35 ciclos)	96°C	10 s
			50°C	5 s
			60°C	4 min
		Hold	4°C	∞

5.4 Caracterización funcional

La transfección y la caracterización electrofisiológica se llevó a cabo en la línea celular HEK-293 (Human Embryonic Kidney) del pase 37 al 50.

5.4.1 Cultivo celular

Las células se mantuvieron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con un 10 % de FBS (Hyclone Laboratories Inc; Logan, UT, EE.UU.), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (Gibco; Waltham, MA, EE.UU.), en una atmósfera humidificada al 5 % de CO₂ a 37°C.

5.4.2 Transfección de los plásmidos en células HEK-293

Se utilizaron células al 60-80% de confluencia para transfectar transitoriamente ambas subunidades del complejo de INa (*SCN5A* y *SCN2B*) en una proporción 1:1, utilizando 400 µg de cada construcción. Para transfectar los genes de los canales iónicos, con y sin mutaciones se utilizó el reactivo Lipofectamina LTX (Invitrogen; Carlsbad, CA, EE.UU.) y se siguieron las instrucciones del fabricante.

Veinticuatro horas después de la transfección, las células se sembraron en cubreobjetos recubiertos de poli-D-lisina. Los registros electrofisiológicos se realizaron 2 horas después de la siembra para asegurar la adhesión de las células al cubreobjetos.

5.4.3 Registro electrofisiológico de la corriente INa (*SCN5A* y *SCN2B*)

Con el fin de obtener las corrientes INa funcionales, se agregaron los 2 plásmidos a la mezcla de transfección, uno que contiene el gen de la subunidad α (*SCN5A*) y otro el de la β (*SCN2B*). Cada subunidad estará marcada con una proteína fluorescente distinta, verde y roja, para α y β, respectivamente. De esta forma, para los experimentos de patch clamp únicamente se registraron las células en las que se detecten ambos colores, indicativo de que ambas subunidades se co-expresaron. Los registros se llevaron a cabo 24 y 48 horas después de la transfección.

En todos los experimentos, la solución externa de registro fue (en mM) 145 NaCl, 5 KCl, 1.3 CaCl₂, 1 MgCl₂, 0.7 NaH₂PO₄, and 10 HEPES; además, se utilizó 6.5 mM NaOH para ajustar el pH a 7.4 y la osmolaridad a 295 mmol/kg. La solución de la pipeta (interna) fue: (en mM) 100 KCl, 35 CsCl, 7 NaCl, 0.1 CaCl₂, 2 MgCl₂, 3 Na₂ATP, 10 EGTA, and 10 HEPES; además, 33 mM KOH para ajustar el pH a 7.3 y la osmolaridad a 300 mmol/kg.

Se utilizó el amplificador *Multiclamp-700B* con la digitalizadora *Digidata 1550*, controlados por el programa *pClamp 10.5*. Las corrientes capacitivas fueron eliminadas electrónicamente. La resistencia en serie fue de 3 a 5 MΩ y fue compensada al 80 %. El potencial de punta fue corregido por 5.5 mV, calculado con el programa JPCalc implementado en *Clampex 10.5*. Las células fueron sostenidas a -85.5 mV.

Para comparar las características biofísicas de las corrientes registradas, se construyeron curvas de activación de las corrientes de cola ajustándolas con la ecuación de Boltzmann.

$$G(V) = \frac{G_{min} - G_{max}}{1 + e^{(V-V_{1/2})/S}} + G_{max}$$

Los parámetros resultantes de los ajustes fueron el voltaje medio de activación ($V_{1/2}$), la conductancia máxima (G_{max}) y la pendiente de la curva (S).

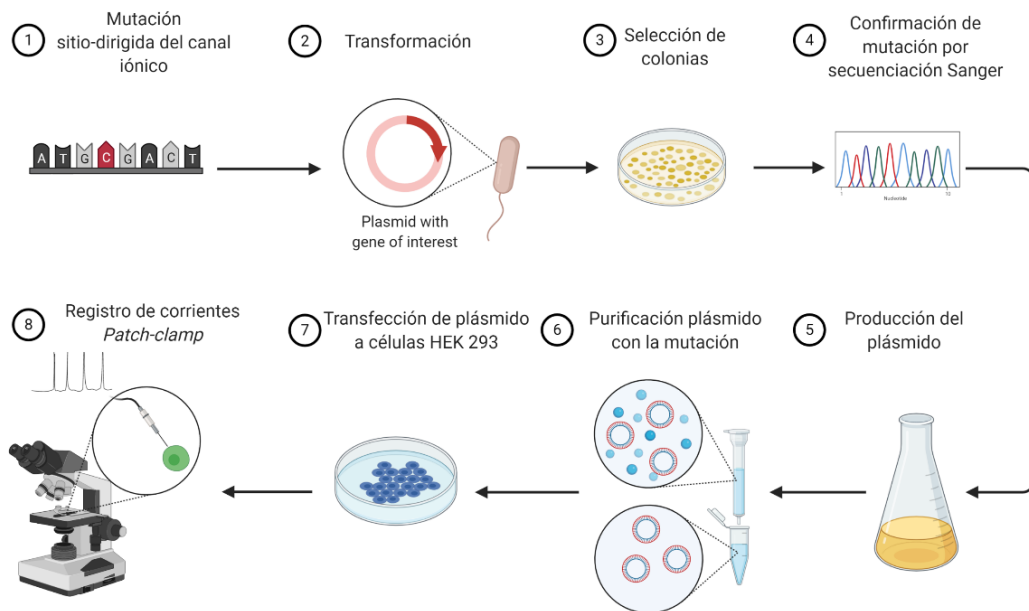


Figura 3. Metodología de la caracterización de mutaciones en canales iónicos cardíacos.

6. Actividades realizadas

- Extracción de sangre venosa
- Extracción de ADN mediante la técnica Salting out
- Cuantificación de ADN genómico y plasmídico
- Electroforesis en gel agarosa
- Preparación de soluciones químicas
- Inventario de reactivos y material de laboratorio
- Asistencia a cursos
- Participación y asistencia a seminarios
- Esterilización de material de laboratorio
- Preparación de medios de cultivo
- Cultivo de cepa *Escherichia coli* DH5 α
- Transformación por choque térmico con plásmidos *SCN5A* WT y con la mutación R893H y T1708N
- Construcción de oligos para *SCN5A*, *KCNQ1* y *LMNA*
- Transformación por electroporación
- Mutagénesis dirigida
- Secuenciación Sanger
- Cultivo y mantenimiento de la línea celular HEK293
- Transfección de plásmidos *SCN5A* WT en células HEK293
- Registros electrofisiológicos en células HEK293 (Patch-clamp)
- Análisis de datos de registros electrofisiológicos

7. Objetivos y metas alcanzadas

1. Construir la mutante Arg893His del gen *SCN5A*. Este objetivo se alcanzó, construimos la mutación R893H del gen *SCN5A* mediante la técnica mutagénesis dirigida.
2. Confirmar la mutante Arg893His del gen *SCN5A* mediante secuenciación Sanger. Este objetivo se alcanzó.
3. Expresar el canal Nav1.5 WT y su mutante Arg893His en células HEK-293. Este objetivo se alcanzó, logramos expresar ambos canales iónicos, WT y mutante.
4. Aprender la técnica de *patch-clamp* en su configuración de célula completa para obtener las características biofísicas de las corrientes iónicas. Este objetivo se alcanzó, la técnica de patch-clamp es compleja y se requiere de un entrenamiento largo para lograr aprenderla y llevarla a cabo. Yo tuve varias horas de entrenamiento frente al equipo de registro y logré realizar exitosamente varios registros, algunos de ellos fueron de canales de potasio. Y dado el periodo de mi servicio social, me faltó tiempo para llevar a cabo registros de la corriente de sodio, únicamente alcancé a hacer un par de la corriente WT.

8. Resultados

8.1 Diseño de oligos

Los primers diseñados para la mutación R893H del plásmido *SCN5A* presentó las siguientes secuencias: R893H-FW: TGGCAAGAACTACTCGGAGC; R893H-RV: ATAATGACTGCCCCGACACC (tabla 7). Para los cuales, se tomaron en cuenta las siguientes características: la longitud del oligo debe ser de 20 a 24 bases para reducir al mínimo la posibilidad de hibridación en sitios secundarios en el vector o inserto, la temperatura de fusión (T_m) sea de 55°C o más, de manera que este por arriba de la temperatura “annealing” y entre los oligos sea $\pm 1^\circ\text{C}$, deben contener de C/G entre 40 y 60 %, y presentar una autocomplementaridad en el programa Blast menor a 4 y en el programa IDTDNA menor a -5 kCal/mol.

Tabla 7. Características de oligo.

Gen:	SCN5A
Rs:	rs199473172
Transcript:	ENST00000413689.6
cDNA_position:	2887
Protein_position:	893
Amino_acids:	R893H
Codons:	CGC-CAC G>A
Cromosoma	3
Existing_variation:	CM100679 SNP
EXON:	28
Quien lo diseño	Eduardo Pérez Díaz
FW	TGGCAAGAACTACTCGGAGC
RV	ATAATGACTGCCCCGACACC GGTGTCGGGGCAGTCATTAT
Tamaño de producto	161
Fecha del diseño	23 agosto de 2022

8.2 Mutagénesis dirigida

La enzima Dpn I es una endonucleasa que reconoce sitios metilados del templado y los digiere, es decir, destruye los sitios metilados dejando únicamente el producto o amplificación sintetizado. Después de la digestión del templado al realizar la electroforesis en gel agarosa, se confirmó la integridad de *SCN5A* R893H obteniendo una banda nítida y específica (~ 12.6 Kb) aproximadamente por encima de la escalera 1 Kb (figura 4).



Figura 4. Prueba de integridad de *SCN5A* R893H.

De las colonias resultantes de la transformación se seleccionaron cinco de ellas, las cuales, mostraron turbidez luego de ser incubadas (figura 4). Después de extraer y purificar el ADN plasmídico se cuantificaron las muestras obteniendo la concentración esperada y la pureza dentro de los valores de referencia para las absorbancias de 260/280 y 260/230 (tabla 4).

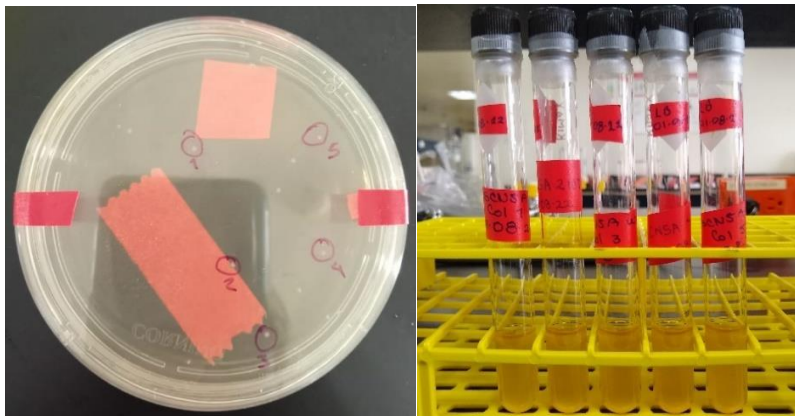


Figura 5. Colonias seleccionadas de *SCN5A* R893H.

La integridad de las colonias de *SCN5A* R893H se confirmó mediante electroforesis en gel agarosa, obteniendo una banda nítida y específica para cada una ellas (~12.6 Kb) (figura 6).

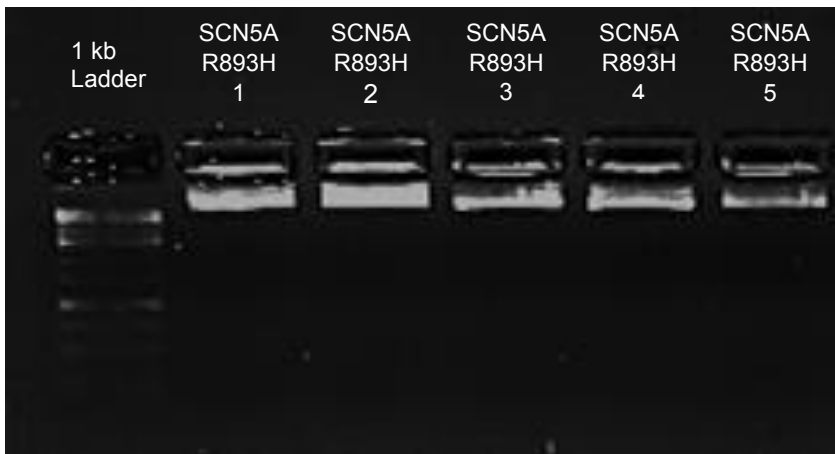


Figura 6. Integridad de colonias *SCN5A* R893H.

8.3 Secuenciación Sanger

La presencia de la mutación R893H en el gen *SCN5A* fue confirmada por Secuenciación Sanger mediante un electroferograma, donde podemos observar el cambio del aminoácido de arginina por una histidina específicamente en la base de una guanina por una adenina (G>A) (figura 7).

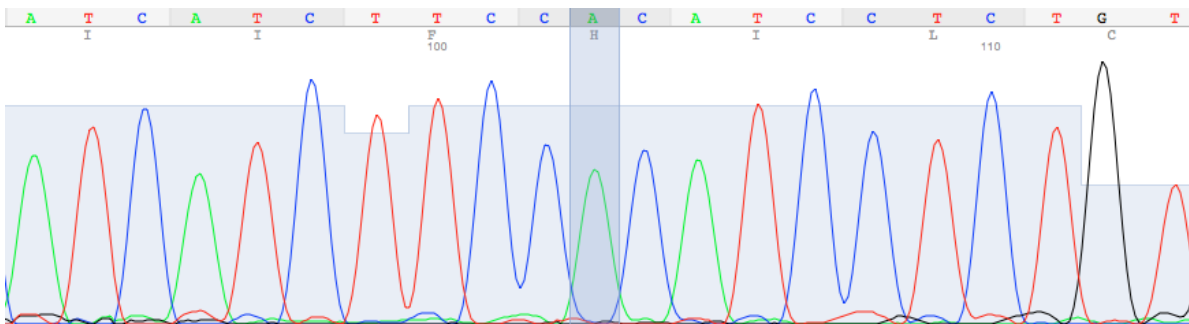


Figura 7. Electroferograma *SCN5A* R893H.

8.4 Caracterización funcional

Se registraron únicamente las células que expresaron ambas proteínas, tanto Nav1.5 (*SCN5A*) de color verde y β (*SCN2B*) de color rojo. Para identificarlas, utilizamos un microscopio de epifluorescencia (figura 8).

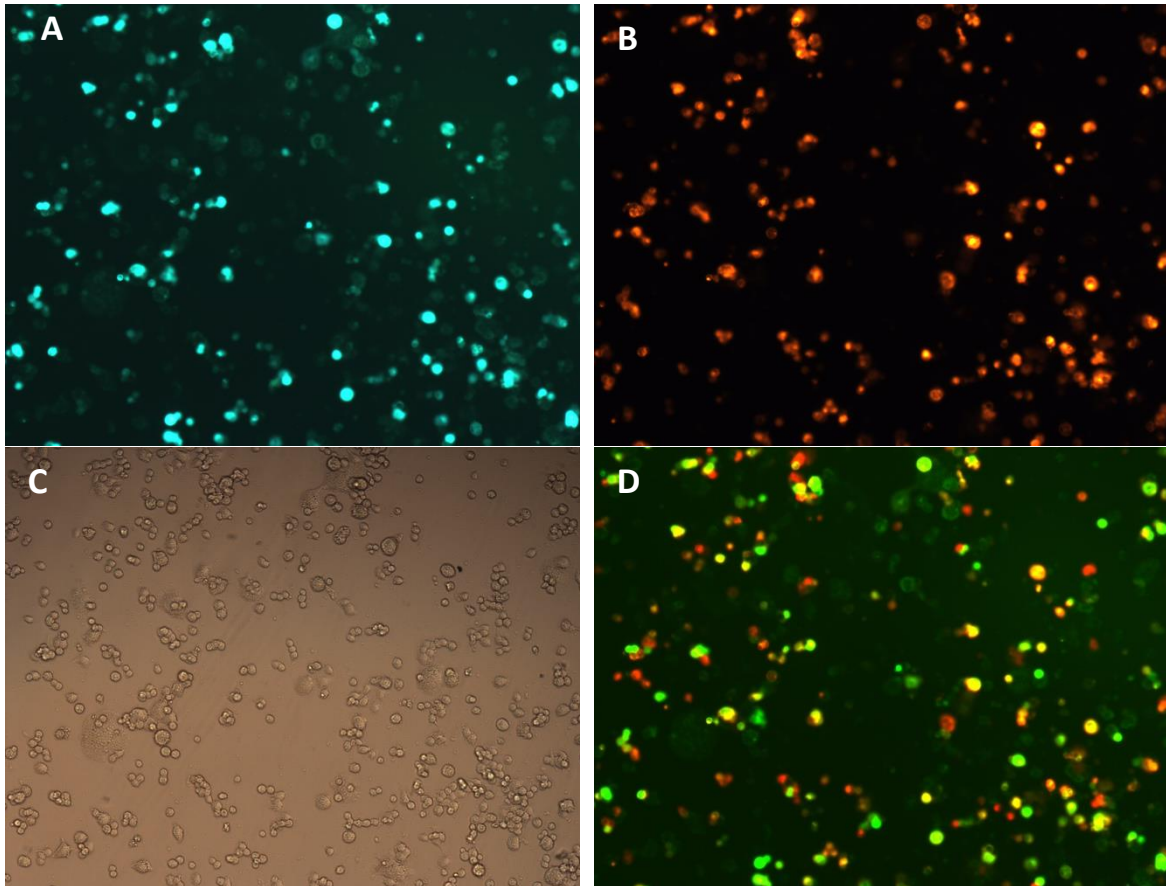


Figura 8. Identificación de células HEK-293 expresando Nav1.5 y β . Empleando un microscopio de epifluorescencia y 24 horas posttransfección se observaron células positivas a: A) A la subunidad α (*SCN5A*, verde); B) A la subunidad β (*SCN2B*, roja). C) Campo claro de la misma región de A y B. D) Superposición de A y B en donde identificamos células que expresan ambas subunidades (células amarillas).

El análisis de los registros obtenidos se realizó utilizando los programas Clampfit y OriginPro 9.0 64-Bit, también se utilizó la plataforma PhysiologyWeb para calcular el potencial de inversión de Na^+ en nuestras soluciones, este dato lo utilizamos para corregir el voltaje comandado. Se obtuvieron las gráficas de activación e inactivación de Na^+ correspondientes al WT (figura 9).

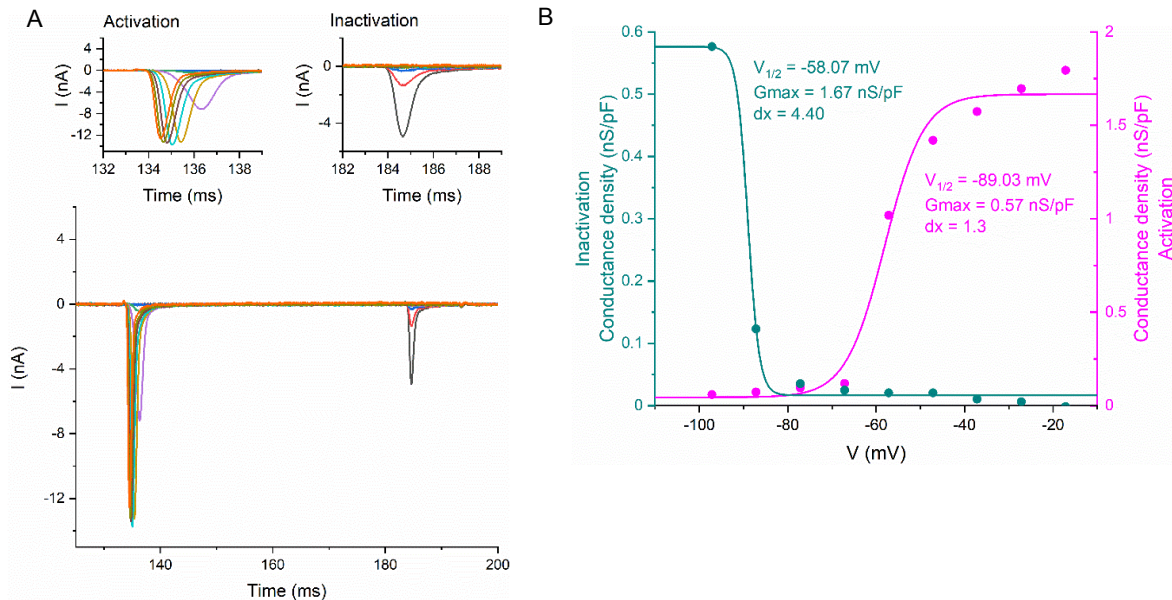


Figura 9. Corriente de Na⁺ silvestre. A) Arriba, insertos del inicio de la activación e inactivación a +10 mV de la corriente silvestre de Na⁺, abajo, familia de trazos de la corriente de Na⁺ silvestre activados por pulsos cuadrados de voltaje (no mostrados). B) Curvas de activación e inactivación de la corriente Na⁺ silvestre.

La corriente de Na⁺ cardíaca se estudió en células HEK-293 transfectando las subunidades Nav1.5 y la subunidad β , como empezamos construyendo la curva control, ambas subunidades fueron silvestres. En la figura 9 se muestran las gráficas correspondientes de los registros electrofisiológicos de la corriente iónica Nav1.5 WT. Utilizamos un protocolo de pulsos cuadrados de voltaje de -100 a +20 mV con incrementos de 10 mV, para activar a la corriente con un pulso fijo a +10 mV al final de los pulsos de prueba para estudiar la inactivación; el potencial de sostenimiento fue de -85 mV después de corregir el voltaje. Así, utilizando el protocolo anterior, se obtuvieron familias de corrientes en donde al inicio del pulso se aprecia la activación de la corriente (Figura 9A) con su cinética característica, un pico rápido transitorio al final del pulso que inactiva por completo. Al final de los pulsos de prueba se programó un pulso fijo a +10 mV para estudiar la inactivación, también con cinética clásica similar a la de la activación. Se construyeron insertos de ambos picos, activación e inactivación, para tener una mejor apreciación de su cinética. Para construir las curvas de activación e inactivación (Figura 9B), se calcularon las conductancias de ambos picos con la fórmula mencionada en métodos y ajustando los puntos con la ecuación de Boltzmann descrita en metodología. El voltaje medio de activación de esta célula ejemplo fue de -89 mV, valor esperado para la subunidad Nav1.5, más negativo que otras subunidades de la familia Nav.

9. Conclusiones

- La caracterización funcional de mutaciones genéticas halladas en pacientes diagnosticados con canalopatías arritmogénicas es fundamental para su estratificación correcta.
- La estratificación de las mutaciones genéticas es de ayuda en el diagnóstico clínico y en la identificación de familiares en riesgo. En el caso particular de las canalopatías arritmogénicas, es de gran importancia la identificación de familiares en riesgo, puesto que personas asintomáticas podrían estar en riesgo de muerte súbita.
- La caracterización funcional de las mutaciones es un trabajo de laboratorio complejo, en particular de los registros electrofisiológicos, requiere de equipo especial y de personas altamente capacitadas para su manejo y obtención de resultados interpretables.
- Esta experiencia me sirvió para aplicar el método científico a un problema real. Fue muy valiosa porque desarrollé habilidades en el laboratorio como cognitivas (capacidad de análisis y resolución de problemas).

10. Recomendaciones

- La mutagénesis dirigida ha sido una herramienta fundamental para la construcción del plásmido con la mutación puntual deseada “R893H” y que posteriormente puede ser utilizado para su caracterización funcional, registrando las corrientes iónicas expresadas en células HEK293.
- Es de suma importancia continuar la caracterización de mutaciones puntuales en los genes que codifican canales iónicos cardíacos y de esta manera obtener datos funcionales que ayuden a lograr su estratificación correcta.
- En mi caso, aprendí que es mejor corroborar la funcionalidad de los plásmidos que se usarán como templados para la mutagénesis dirigida, haciendo registros electrofisiológicos, antes de iniciar con la construcción de las mutaciones.

11. Bibliografía

1. González-Melchor, L., Villarreal-Molina, T., Iturralde-Torres, P., & Medeiros-Domingo, A. (2014). Muerte súbita cardiaca en el corazón estructuralmente normal: una actualización [Sudden cardiac death in individuals with normal hearts: an update]. *Archivos de cardiología de México*, 84(4), 293–304. <https://doi.org/10.1016/j.acmx.2014.04.002>
2. Mizusawa Y. (2016). Recent advances in genetic testing and counseling for inherited arrhythmias. *Journal of arrhythmia*, 32(5), 389–397. <https://doi.org/10.1016/j.joa.2015.12.009>
3. Cerrone, M., & Priori, S. G. (2011). Genetics of sudden death: focus on inherited channelopathies. *European heart journal*, 32(17), 2109–2118. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr082>
4. Li, W., Yin, L., Shen, C., Hu, K., Ge, J., & Sun, A. (2018). SCN5A Variants: Association With Cardiac Disorders. *Frontiers in physiology*, 9, 1372. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01372>
5. Zumhagen, S., Veldkamp, M. W., Stallmeyer, B., Baartscheer, A., Eckardt, L., Paul, M., Remme, C. A., Bhuiyan, Z. A., Bezzina, C. R., & Schulze-Bahr, E. (2013). A heterozygous deletion mutation in the cardiac sodium channel gene SCN5A with loss- and gain-of-function characteristics manifests as isolated conduction disease, without signs of Brugada or long QT syndrome. *PLoS one*, 8(6), e67963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067963>
6. Gallardo Pérez, M.M. (2017). Caracterización electrofisiológica de la mutante del canal de sodio Kv7.1 D446E expresado en células CHO-K1. [Tesis de Maestría, Instituto de Fisiología]. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
7. Kapplinger, J. D., Tester, D. J., Alders, M., Benito, B., Berthet, M., Brugada, J., Brugada, P., Fressart, V., Guerchicoff, A., Harris-Kerr, C., Kamakura, S., Kyndt, F., Koopmann, T. T., Miyamoto, Y., Pfeiffer, R., Pollevick, G. D., Probst, V., Zumhagen, S., Vatta, M., Towbin, J. A., ... Ackerman, M. J. (2010). An international compendium of mutations in the SCN5A-encoded cardiac sodium channel in patients referred for Brugada syndrome genetic testing. *Heart rhythm*, 7(1), 33–46. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2009.09.069>
8. Kline, J., & Costantini, O. (2019). Inherited Cardiac Arrhythmias and Channelopathies. *The Medical clinics of North America*, 103(5), 809–820. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2019.05.001>
9. Amin, A. S., Asghari-Roodsari, A., & Tan, H. L. (2010). Cardiac sodium channelopathies. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 460(2), 223–237. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0761-0>
10. Stecker, E. C., Reinier, K., Marijon, E., Narayanan, K., Teodorescu, C., Uy-Evanado, A., Gunson, K., Jui, J., & Chugh, S. S. (2014). Public health burden of sudden cardiac death in the United States. *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology*, 7(2), 212–217. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.113.001034>

11. Myerburg R. J. (2001). Sudden cardiac death: exploring the limits of our knowledge. *Journal of cardiovascular electrophysiology*, 12(3), 369–381. <https://doi.org/10.1046/j.1540-8167.2001.00369.x>
12. Priori, S. G., Blomström-Lundqvist, C., Mazzanti, A., Blom, N., Borggrefe, M., Camm, J., Elliott, P. M., Fitzsimons, D., Hatala, R., Hindricks, G., Kirchhof, P., Kjeldsen, K., Kuck, K. H., Hernandez-Madrid, A., Nikolaou, N., Norekvål, T. M., Spaulding, C., Van Veldhuisen, D. J., & Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology (ESC) (2015). 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: The Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology (ESC) Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC). *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology*, 17(11), 1601–1687. <https://doi.org/10.1093/europace/euv319>
13. Cerrone, M., Cummings, S., Alansari, T., & Priori, S. G. (2012). A clinical approach to inherited arrhythmias. *Circulation. Cardiovascular genetics*, 5(5), 581–590. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.110.959429>
14. Fonseca, D. J., & Vaz da Silva, M. J. (2018). Cardiac channelopathies: The role of sodium channel mutations. Canalopatias cardíacas: o papel das mutações nos canais de sódio. *Revista portuguesa de cardiologia*, 37(2), 179–199. <https://doi.org/10.1016/j.repc.2017.11.007>
15. Behere, S. P., & Weindling, S. N. (2015). Inherited arrhythmias: The cardiac channelopathies. *Annals of pediatric cardiology*, 8(3), 210–220. <https://doi.org/10.4103/0974-2069.164695> utilizar para potencial de acción
16. Meregalli, P. G., Wilde, A. A., & Tan, H. L. (2005). Pathophysiological mechanisms of Brugada syndrome: depolarization disorder, repolarization disorder, or more?. *Cardiovascular research*, 67(3), 367–378. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.03.005>
17. Abe, K., Machida, T., Sumitomo, N., Yamamoto, H., Ohkubo, K., Watanabe, I., Makiyama, T., Fukae, S., Kohno, M., Harrell, D. T., Ishikawa, T., Tsuji, Y., Nogami, A., Watabe, T., Oginosawa, Y., Abe, H., Maemura, K., Motomura, H., & Makita, N. (2014). Sodium channelopathy underlying familial sick sinus syndrome with early onset and predominantly male characteristics. *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology*, 7(3), 511–517. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.113.001340>
18. Abriel, H., & Kass, R. S. (2005). Regulation of the voltage-gated cardiac sodium channel Nav1.5 by interacting proteins. *Trends in cardiovascular medicine*, 15(1), 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2005.01.001> para scn5a
19. Han, D., Tan, H., Sun, C., & Li, G. (2018). Dysfunctional Nav1.5 channels due to SCN5A mutations. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 243(10), 852–863. <https://doi.org/10.1177/1535370218777972>

20. Ooi, A., Wong, A., Esau, L., Lemtiri-Chlieh, F., & Gehring, C. (2016). A Guide to Transient Expression of Membrane Proteins in HEK-293 Cells for Functional Characterization. *Frontiers in physiology*, 7, 300. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00300>
21. Chen, P. S., & Priori, S. G. (2008). The Brugada syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*, 51(12), 1176–1180. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.12.006>