

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO**



**EXPRESIÓN DE CANALES DE CALCIO
ACTIVADOS POR VOLTAJE EN EL DESARROLLO
TEMPRANO DE PEZ-CEBRA (*Danio rerio*)**

**Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al
Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.**

ANDRO MONTOYA RIVEROS

PATROCINANTE
Dr. Miguel Allende
Departamento de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile.

DIRECTOR
Dr. Manuel Kukuljan
Laboratorio de Neurobiología Celular
y Molecular
Programa de Fisiología y Biofísica
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Santiago de Chile, abril 2010



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr.

Andro Montoya Riveros

“EXPRESIÓN DE CANALES DE CALCIO ACTIVADOS POR VOLTAJE EN EL DESARROLLO TEMPRANO DE PEZ-CEBRA (*Danio rerio*)”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Manuel Kukuljan Padilla
Director Seminario de Título

Comisión de Evaluación

Dr. Juan Bacigalupo Vicuña
Presidente Comisión

Firma manuscrita de Juan Bacigalupo Vicuña, sobre una línea horizontal.

Dr. Ricardo Cabrera Paucar
Evaluador

Firma manuscrita de Ricardo Cabrera Paucar, sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, abril de 2010



Vengo al mundo desde una pareja de amantes jóvenes y creativos. La Edita, mi madre, y el Chino Montoya, mi padre, quienes pese a vivir en un tiempo de temor y represión, se encontraban protegidos por una atmósfera cargada de amistad, ideas, amor y arte. En ella conocí a mis mejores amigos aun cuando no salía del vientre de mi madre. Y en ella aprendí a percibir lo hermoso de la vida, y el placer de conocer. Siempre queriendo saber cómo es, cómo se forma, cómo funciona, recibía pequeño relatos sobre el flujo de la sangre dentro de nosotros, y mi Tata me juntaba enciclopedias de los periódicos. De pequeño me invitaron a disfrutar de bosques, lagos y estrellas. Disfrutaba de la tecnología y mi Atari. Disfrutaba de los murales que pintaban los grandes. Fui un niño mimado, pero tranquilo, llorón, pero muy, muy alegre...bueno aun lloro, pero ahora casi siempre es de alegría.

Estudí hasta mis 11 años a pasos de mi hogar, en el barrio en donde aun vivo. Luego viajaba en microbús al Liceo de Aplicación, años en que crecía mi inquietud sobre la existencia, y descubrí mi entorno, los anhelos, los dolores, las esperanzas. Y también incorporaba en mí una forma de reconocer todo en lo que estaba inmerso, las Ciencias. Disfruté mucho de lo aprendido, asombrado por las geometrías de cuadros renacentistas que nos enseñaba el profesor de arte, y fascinado por la compleja belleza de la biología. En los últimos años de liceo escuche la palabra Biotecnología y conocí algo más del amor.

Ingresé a la Universidad de Chile, a saciar mi sed de conocer aquella compleja belleza de lo vivo, entre a la carrera de Ing. en Biotecnología Molecular, en la Facultad de Ciencias, con árboles grandes en su patio. Un universo se abría para mí, y feliz me sumergí en horas de intención y dedicación. Conocí de frustración y felicidad en lo académico y afectivo. Comprendí de organización y algo sobre el flujo de la vida. Y sentí que el amor tenía algo de natural, como un ser vivo. Volví a dibujar.

Fui a la Facultad de Medicina a realizar ciencia con mis manos. Comencé en cáncer e inmunología, luego seguí en neurociencias y desarrollo. El Dr Manuel Kukuljan me permitió experimentar en su laboratorio por dos años, realizar el seminario de título, y presenciar un nivel de excelencia científica, el cual felizmente me gustaría lograr algún día. También en aquel tiempo comencé a colorear muros.

Alejado del mesón y pipetas, escribí y corregí por largo tiempo, conociendo lugares, colores, gente, sentimientos, pensamientos, más colores, más lugares, más seres. Sentí, y mucho después comprendí que todo se conecta con todo, que el desconocerlo es miedo, que el reconocerlo es amor. Que el infinito es hacia fuera y hacia dentro, y que es un gran fractal. Y que la Ciencia y el Arte más que separados, están unidos por la creatividad, belleza, versatilidad, dedicación, amor, entre varias más.

Hoy mi sed de ciencia es aun mayor, mi sentimiento de integración con el universo así lo ha cultivado. Agradezco a todos quienes han colaborado a mi felicidad en el conocer y amar.

DEDICATORIA

***Dedicada a todos quienes cultivan
la felicidad de hacer del Arte y la
Ciencia su forma de existir.***

AGRADECIMIENTOS

A mi padre y madre, por su fuerza, paciencia, alegría y amor, que han hecho de mi vida una hermosa historia de saber y amar.

A mis amigos, que en realidad son mis hermanos, por su fraterna creatividad y alegría compartida.

Al Doctor Manuel Kukuljan, por permitirme llevar a cabo mi seminario de título, por su respaldo y por ser para mí, un referente de cómo hacer ciencia.

A las personas del Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular, mis compañeros, académicos y técnicos, siempre dispuestos a colaborar con mi trabajo.

A las personas del Laboratorio de Miguel Concha, en especial a quien se encarga del vivero y a Alejandra Catenaccio, por su incondicional apoyo y asesorías.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
• El Calcio en los sistemas vivos.....	1
• Canales de calcio activados por voltaje (CaV).....	2
• El calcio como segundo mensajero y su importancia en el desarrollo de vertebrados.....	6
• Expresión de CaV en el desarrollo temprano.....	9
• Hipótesis.....	13
• Objetivo general.....	13
• Objetivos específicos.....	13
MATERIALES.....	14
• Embriones de pez cebra.....	14
• Extracción RNA y síntesis cDNA.....	14
• PCR.....	15
• Clonamiento de secuencias homólogas a CaV.....	15

• Bacterias.....	15
• Medios de cultivo para bacterias.....	15
• Generación de Sondas de RNA.....	16
• Hibridación <i>In-Situ</i>	16
• Cultivos de Células embrionarias.....	18
• Inmunofluorescencia.....	18
MÉTODOS.....	19
• Búsqueda de secuencias con homología a los CaVs.....	19
• Síntesis de partidores.....	19
• Obtención de embriones.....	20
• Mantención de embriones.....	20
• Recolección de muestras.....	21
• Extracción de mRNA.....	21
• Síntesis de cDNA.....	22
• PCR.....	23
• Extracción y purificación de productos de PCR.....	24
• Clonación de productos de PCR.....	24
• Secuenciación y análisis.....	25
• Cultivo de células embrionarias.....	25
• Inmunofluorescencia.....	26
• Obtención de imágenes con microscopia confocal.....	27
• Síntesis de sondas de RNA.....	27
• Hibridación <i>In-Situ</i>	28

RESULTADOS.....	30
• Conservación aminoacídica entre CaV α 1 de ratón y pez-cebra.....	30
• Secuencias homólogas a CaV en el genoma de pez cebra.....	33
• Expresión de secuencias homólogas a CaV α 1 en pez-cebra juvenil.....	39
• Expresión de secuencias homólogas a CaV α 1 en embriones de pez-cebra.....	39
• Identificación de secuencias homólogas a CaV α 1 expresadas en pez-cebra.....	41
• Hibridación <i>In-Situ</i> de mRNA de CaV detectados por RT-PCR.....	44
• Expresión de la proteína alfa-1 CaV.....	48
DISCUSIÓN.....	53
• Secuencias homólogas a CaV en el genoma de pez cebra.....	53
• Expresión e identidad de las secuencias homólogas a CaV en pez cebra.....	55
• Expresión de CaVs durante el desarrollo de pez cebra.....	56
• Observación de los mRNA de CaV mediante Hibridación <i>In-Situ</i>	61
• Expresión de la proteína CaV α 1.....	63
CONCLUSIONES.....	65
REFERENCIAS.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura molecular de los CaV.....	3
Figura 2.	Tipos de CaVα conocidas.....	5
Figura 3.	Desarrollo embrionario de pez cebra.....	12
Figura 4.	Análisis filogenético y comparativo de las secuencias aminoacídicas de las CaVα conocidas.....	32
Figura 5.	Consenso aminoacídico de las secuencias de subunidad α1 escogidas.....	34
Figura 6.	Alineamiento entre los consensos aminoacídicos de CaVα1 de ratón y pez-cebra.....	35
Figura 7.	Secuencia consenso de la subunidad α1 entre ratón y pez-cebra.....	35
Figura 8.	Locación cromosómica de secuencias homólogas al consenso de α1 en el genoma de pez-cebra.....	36
Figura 9.	Secuencias homólogas a CaVα1 en el genoma de pez-cebra.....	37
Figura 10.	Expresión de secuencias homólogas a la subunidad α1 de CaV en pez-cebra.....	40

Figura 11.	Ubicación en el cariotipo de pez-cebra de las secuencias homólogas a CaV α 1 encontradas.....	43
Figura 12.	Hibridación <i>In-Situ</i> de embriones completos usando sondas contra mRNA de CaV α 1 putativos.....	45
Figura 13.	Hibridación <i>In-Situ</i> de embriones completos usando sondas contra mRNA de CaV α 1 putativos (Mayor magnificación).....	46
Figura 14.	Patrón de expresión de cntn2 en embrión de pez-cebra.....	47
Figura 15.	Análisis de la conservación del etípote detectado por Anti-pan CaV.....	48
Figura 16.	Expresión de la proteína CaV α 1 en células embrionarias en cultivo.....	50
Figura 17.	Ensayo de preabsorción del anticuerpo Anti-pan CaV α 1.....	52
Figura 18.	Carta Gantt de la expresión de los CaVs durante el desarrollo embrionario de pez-cebra.....	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Secuencias peptídicas escogidas de CaV de ratón y pez-cebra.....	31
Tabla 2.	Secuencia de partidores utilizados en RT-PCR.....	38
Tabla 3.	Códigos de acceso a las secuencias homólogas a CaV α1 encontradas.....	42
Tabla 4.	Identificación y ubicación de las secuencias homólogas a CaV.....	43

ABREVIATURAS

aa:	Aminoácido.
CaV:	Canal de calcio activado por despolarización.
CaV α 1:	Subunidad alfa-1 de CaV.
CaV β :	Subunidad beta de CaV.
CaV α 2 δ :	Subunidad alfa-2 delta de CaV.
CaV γ :	Subunidad gama de CaV.
Cntn2:	Contactina 2.
cDNA:	Ácido desoxirribonucleico complementario.
DEPC:	Dietilpirocarbonato.
DHP:	Dihidropiridina.
dNTP:	Desoxirribonucleótidos trifosfato.
DTT:	Ditiotreitol
hpf:	Horas post-fertilización.
EST:	Secuencia marcada como expresada (Expressed Sequence Tag).
HVA:	CaV activado con alto voltaje (High Voltage Activated).
KDa:	Kilo Dalton.
LB:	Luria Bertani (medio de cultivo bacteriano).
LVA:	CaV activado con bajo voltaje (Low Voltage Activated).
mRNA:	Ácido ribonucleico mensajero.
pb:	Pares de bases.
RNA:	Ácido ribonucleico.
SH:	Secuencia homóloga a consenso de CaV α 1.

RESUMEN

El Ca^{+2} , mediante su interacción con múltiples proteínas, es componente importante de fenómenos como la excitabilidad de células y el desarrollo embrionario de vertebrados.

Un tipo de proteínas encargadas de su transporte son los canales de calcio activados por despolarización (CaV), los cuales inicialmente fueron clasificados por sus propiedades electrofisiológicas en tres grupos: CaV tipo-L, CaV tipo-T y CaV tipo neuronal (tipo-N, tipo-P/Q y tipo-R). Los CaVs son un complejo proteico conformado por 4 subunidades: alfa ($\text{CaV}\alpha 1$), beta ($\text{CaV}\beta$), alfa2delta ($\text{CaV}\alpha 2\delta$) y gama ($\text{CaV}\gamma$).

El componente principal de ese complejo es la subunidad $\text{CaV}\alpha 1$, la cual posee el poro que conduce al ión calcio, y la capacidad de detectar el voltaje. $\text{CaV}\alpha 1$ es una proteína de entre 190-250 kDa. que posee cuatro dominios transmembrana homólogos, cada uno compuesto por seis segmentos transmembrana.

El conocimiento molecular de las secuencias que codifican los diferentes tipos de $\text{CaV}\alpha 1$ ha permitido clasificar filogenéticamente a las $\text{CaV}\alpha 1$, generándose tres familias: CaV1 (tipo-L), CaV2 (tipo neuronal) y CaV3 (tipo-T).

Durante el desarrollo temprano de vertebrados, elevaciones transitorias de calcio toman la forma de ondas que se propagan y que constituirían una señal requerida para procesos como citocinesis y reordenamiento del citoesqueleto. También ha sido demostrada la participación de $\text{CaV}\alpha 1$ en etapas tempranas del desarrollo, controlando procesos como el destino dorso-ventral del mesodermo. En etapas más tardías, se ha demostrado su papel en la diferenciación celular y organogénesis de pez-cebra, entre otros vertebrados.

Estos antecedentes motivaron la búsqueda de la expresión de otros CaV de pez-cebra durante su desarrollo embrionario.

Se recopilaron secuencias aminoacídicas de CaV α 1 de ratón y pez-cebra, se compararon entre sí y se obtuvo un consenso aminoacídico representativo de las zonas conservadas de CaV α 1. Esta secuencia consenso fue ingresada como consulta en la base de datos de Ensembl, para encontrar secuencias homólogas en el genoma de pez-cebra, mediante el algoritmo BLAST. Posteriormente se diseñaron partidores específicos para cada secuencia homóloga encontrada y se analizó su expresión en juveniles (2 meses), y en embriones tardíos (25 y 35 hpf.) y tempranos (75% epibolia).

Se observó la expresión de 10 secuencias homólogas a CaV α 1 en pez-cebra juvenil. En embriones, el patrón de expresión varía de acuerdo al tiempo de desarrollo. Se detectó la presencia de al menos 5 tipos de mRNA codificante para CaV α 1 durante el periodo de gastrulación.

Se analizó el patrón de expresión espacial de tres de estos mRNA mediante hibridación *in-situ*. En embriones de 48 hpf. se observa marca en las zonas correspondiente al sistema cardiovascular, nervioso y locomotor en desarrollo. Sin embargo, debido a la similitud entre la marca de las sondas antisentido y sentido (control), no fue posible determinar este patrón espacial de expresión con certeza.

Posteriormente se analizó mediante inmunofluorescencia la presencia de la proteína CaV α 1 usando un anticuerpo "pan CaV α 1" en células embrionarias en cultivo, con desarrollo equivalente al término de la gastrulación. Se observó una intensa marca, lo que confirma la traducción de al menos uno de los mRNA detectados por RT-PCR durante el desarrollo temprano de pez-cebra.

INTRODUCCIÓN

El Calcio en los sistemas vivos.

Uno de los iones de mayor relevancia para el funcionamiento de los sistemas vivos es el Ca^{+2} . La capacidad de este ión de participar como modulador en una amplia gama de funciones celulares, se debe a la existencia de una gran cantidad de proteínas, que de una u otra forma, son capaces de unirse a este catión, cambiando su estructura y función de una manera reversible, lo cual genera una gran variedad de interacciones con proteínas de la célula. Así, alcanza una importante participación en procesos biológicos como contracción muscular, neurotransmisión, proliferación, diferenciación, excitabilidad, aprendizaje y memoria, entre otros.

Gran parte del calcio presente en los organismos vivos se encuentra a nivel extracelular a una concentración de 10^{-3} M, en cambio, las células mantienen concentraciones citosólicas de Ca^{+2} libre cercanas a 10^{-7} M. Esto determina un gradiente de varios órdenes de magnitud con el medio extracelular y con compartimientos intracelulares, como el retículo endoplásmico. Este gradiente permite el rápido ingreso de Ca^{+2} al citosol a través de canales presentes en la membrana plasmática o membranas intracelulares, gatillados como consecuencia de procesos de transducción de señales. Una vez que el Ca^{+2} ha efectuado su función señalizadora, es rápidamente removido del citosol por una serie de proteínas que cumplen la función de bombas e intercambiadores iónicos. La bomba Ca^{+2} -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) y el intercambiador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ (NCX) se encargan de retirar el Ca^{+2} al exterior, mientras que en el retículo sarco-endoplásmico la bomba ATPasa (SERCA) devuelve el Ca^{+2} a los reservorios internos. Este fenómeno permite aumentos

transitorios de Ca^{+2} citoplasmático hasta valores cercanos a 10^{-6} M, en orden de segundos o unos pocos minutos (Berridge y cols., 2000). Esto colabora aún más con la versatilidad que posee este ión como señalizador en importantes procesos fisiológicos (Lodish y cols., 2004).

De especial interés en este trabajo son las proteínas de membrana que permiten el ingreso el Ca^{+2} desde el medio extra celular. Este influjo de Ca^{+2} es mediado por canales iónicos, entre los cuales se encuentran aquellos que son regulados por cambios en el potencial de membrana, y que son comúnmente conocidos como canales de Ca^{+2} activados por voltaje (Catterall, y cols. 2000), existiendo además, otros canales iónicos dentro de la superfamilia de los canales TRP (transient receptor potencial), que también dejan entrar Ca^{+2} , pero que son regulados por otros mecanismos.

Canales de calcio activados por voltaje (CaV).

Los CaV son un complejo proteico que puede constar de hasta cuatro subunidades, denominadas alfa1 ($\text{CaV}\alpha 1$), beta ($\text{CaV}\beta$), alfa2delta ($\text{CaV}\alpha 2\delta$) y gamma ($\text{CaV}\gamma$) (Figura 1). La principal de estas subunidades es la alfa1, puesto que conforma el poro por el cual atraviesa el ión en la membrana, además del dominio que le permite detectar los cambios de potencial eléctrico. El RNA mensajero de esta proteína es de aproximadamente 6.000 nucleótidos, y codifica para una proteína de cerca de 2.000 aminoácidos que posee un peso molecular de entre 190 y 250 KDa. Las corrientes de calcio que pasan a través de $\text{CaV}\alpha 1$ son moduladas por interacciones con diferentes subunidades auxiliares ($\text{CaV}\beta$, $\text{CaV}\alpha 2\beta$, $\text{CaV}\gamma$).

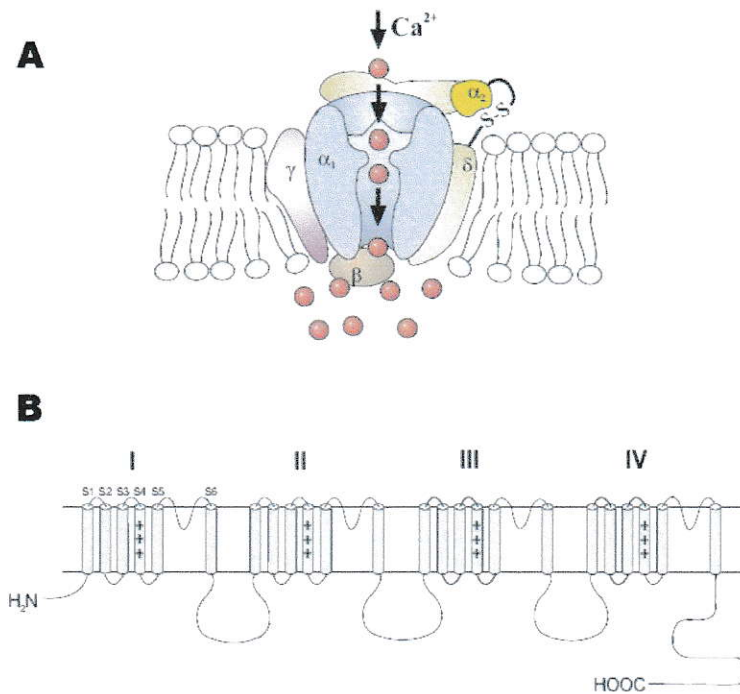


Figura 1. Estructura molecular de los CaV.

(A) Modelo de la estructura de los CaV. La subunidad α_1 (CaV α_1) es el componente principal del complejo proteico que forma los CaVs, puesto que ésta proteína transmembrana contiene el poro conductor del ión calcio y la zona capaz de detectar la despolarización de la membrana. CaV α_1 es regulada por subunidades auxiliares: subunidad intracelular beta (CaV β), la subunidad transmembrana gamma (CaV γ), y por el complejo compuesto por la subunidad extracelular alfa2 y la subunidad transmembrana delta unidas por un puente disulfuro (CaV $\alpha_2\delta$). (B) Esquema de los dominios transmembrana de CaV α_1 . La subunidad alfa1 está compuesta por cuatro dominios homólogos (I – IV), de los cuales cada uno contiene 6 segmentos transmembrana (S1- S6). El poro por donde se transporta el Ca^{+2} es formado por los segmentos S5 y S6. Los segmentos transmembrana son estructuras de hélice- α y son representados por cilindros. El cuarto segmento de cada dominio transmembrana (S4) contiene una carga neta positiva. Las imágenes son adaptadas desde Lacinová, 2005.

La subunidad beta es una proteína hidrofílica que está localizada intracelularmente, unida a la subunidad alfa1, y posee un peso molecular en el rango de 50 a 78 KDa. La subunidad alfa2delta es una proteína glicosilada que es codificada por un solo gen. El RNA mensajero de esta subunidad es traducido como un péptido precursor que es clivado post-traduccionalmente. Consta de dos cadenas (alfa2 y delta) unidas mediante puentes disulfuro. La parte delta se ancla en la membrana celular. La subunidad gama es una proteína de membrana que consta de 222 residuos, con una masa molecular de aproximadamente de 25 KDa (Arikkath y Campbell, 2003; Catterall, 2000).

Los canales de calcio fueron caracterizados inicialmente en términos de sus propiedades fármaco y electrofisiológicas, clasificándose en grupos denominados como tipo L, N, P/Q, R y T. Sin embargo desde la identificación molecular de los genes que codifican estas proteínas, la diversidad conocida de subunidades de los CaVs ha incrementado fuertemente. Actualmente los CaVs son clasificados en tres familias denominadas CaV 1, CaV 2 y CaV 3, agrupadas según el grado de similitud de las secuencias nucleotídicas de la subunidad alfa1. La figura 2 muestra los distintos tipos de CaV conocidos y su relación filogenética.

En los genomas de mamíferos más caracterizados, la familia CaV 1 consta de cuatro miembros (CaV 1.1 a 1.4), los cuales son canales de Ca^{+2} del tipo L, y son bloqueados por dihidropiridinas (DHP). Estos canales presentan una amplia distribución en corazón, músculo liso, cerebro, músculo esquelético, y algunos tejidos endocrinos (Lacinová, 2005).

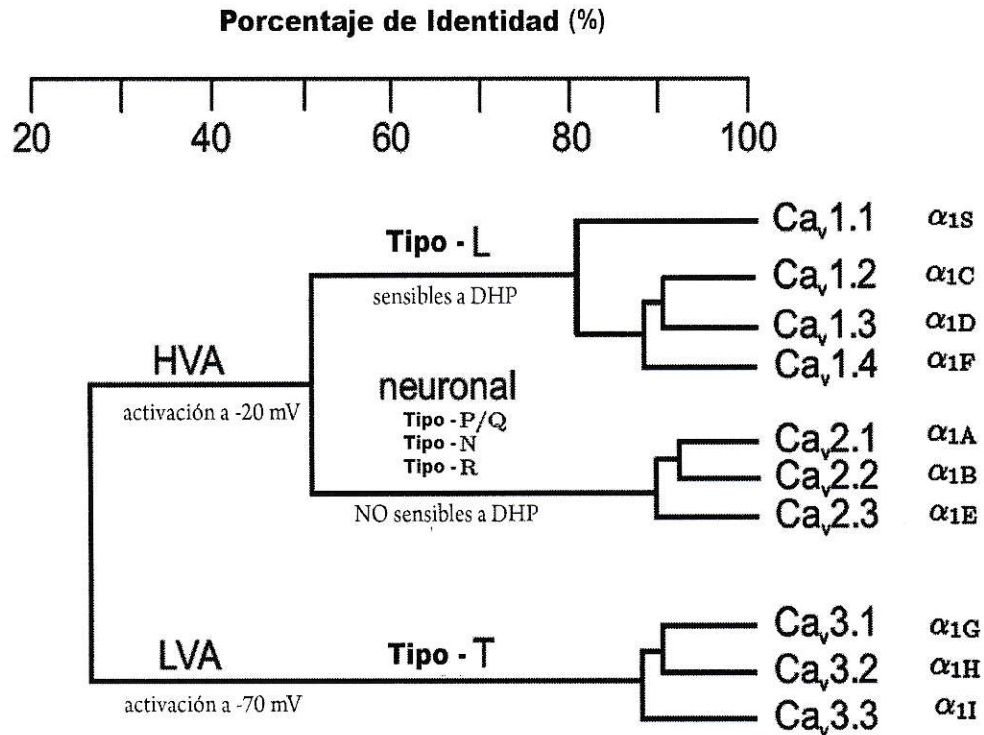


Figura 2. Tipos de CaVs conocidos.

Dendrograma filogenético que incluye los tipos de CaVs conocidos. Se observan los distintos nombres con que se han denominado los CaVs. La imagen es una adaptación de Lacinová, 2005.

Los CaV de la familia CaV 2 son insensibles al efecto de la DHP (es decir, no son del tipo L). La familia está compuesta por los CaV 2.1 a 2.3 y son, predominantemente expresados en el sistema nervioso. Esta familia incluye a canales del tipo R, P/Q y N. Los tres miembros de esta familia son regulados por proteínas G y se pueden unir directamente a proteínas SNARE. Las familias CaV 1 y CaV 2 se activan potenciales de membranas relativamente depolarizados y se inactivan de manera relativamente lenta (Lacinová, 2005).

La familia de canales CaV 3 (Cav 3.1 a 3.3) son llamados del tipo T, y son activados con menor despolarización de la membrana plasmática. Estos canales son activados por potenciales más negativos e inactivados rápidamente. Los CaV 3 exhiben pequeñas conductancias y presentan tasas de desactivación lentas. La regulación de esta familia está menos estudiada, pero existen reportes que muestran efectos de regulación mediados por fosforilación de proteínas y por proteínas G (Lacinová, 2005).

El calcio como segundo mensajero y su importancia en el desarrollo de los vertebrados.

Los huevos de vertebrados e invertebrados, e incluso algunos tipos de semillas, son activados por la generación de elevaciones transitorias de la concentración de calcio en su citoplasma. En muchos casos, estas elevaciones transitorias de calcio toman la forma de ondas de calcio que se propagan y que constituirían una señal requerida para la activación de los huevos. El mecanismo por el cual se iniciarían esas ondas de propagación aún no está del todo claro. Se ha sugerido que estas ondas están involucradas en una variedad de procesos que ocurren durante el desarrollo temprano de los vertebrados, incluyendo la exocitosis cortical de gránulos, reordenamiento del citoesqueleto y progresión del ciclo celular. Durante las divisiones tempranas se observan zonas de alta concentración de Ca^{+2} , las que corresponden a los surcos de las divisiones. La zona de alta concentración de Ca^{+2} durante la primera división se extiende como una onda lenta precedida por pulsos de Ca^{+2} en la zona animal del huevo (Créton y cols., 1998).

Un paso esencial en el desarrollo temprano del pez cebra involucra un reordenamiento drástico de toda la morfología de cigoto. Esto es llevado a cabo a

través de un proceso conocido como segregación ooplásmica, durante el cual, el ooplasma es separado desde el vitelo y se acumula en el polo animal para formar el blastodisco. Existe evidencia sobre la importancia de las ondas de calcio en la citocinesis de los blastómeros, pero éstas se encontrarían restringidas a dominios muy localizados. Estas elevaciones transitorias localizadas no requieren de calcio externo, lo que sugiere que se originarían a partir de la liberación de calcio desde reservorios internos. Durante el período de blástula tienen lugar procesos claves para el desarrollo, por ejemplo, ocurre una serie de divisiones rápidas y sincrónicas que dan origen a una gran cantidad de células indiferenciadas sobre el vitelo. Durante las primeras cuatro horas de desarrollo, todos los genes que se expresan en el embrión tienen un origen materno. Alrededor del décimo ciclo de división celular ocurre la transición a blástula media (MBT), comenzando la transcripción del genoma del cigoto. Se forma la capa sincicial del vitelo (YSL) y comienza la gastrulación, que en pez cebra ocurre de una manera conocida como epibolia, en la cual las células que darán origen al embrión se desplazan cubriendo el vitelo y además experimentan los procesos de extensión convergente e involución que formarán las capas germinales. Es durante este período en que se puede observar la transición de señales de Ca^{+2} intracelulares a intercelulares. Al comienzo de la blástula las señales intercelulares de Ca^{+2} serían un fenómeno localizado, con un número reducido de células comunicándose entre ellas.

En los embriones de pez-cebra estas señales se encuentran restringidas a las células de la capa envolvente (EVL) y se ha sugerido que una de sus funciones sería aumentar la adhesión célula-célula. Cuando el embrión entra en el proceso de gastrulación, comienza a ser evidente el plan básico de la estructura del cuerpo, comienzan los movimientos morfogenéticos de involución, extensión y convergencia, produciendo la capa germinal primaria y los ejes embrionarios. Los pasos importantes

durante el desarrollo temprano de los organismos son, por lo tanto, la formación de las capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), y de los ejes del cuerpo (dorso-ventral y antero-posterior). De esta manera, a partir de reordenamientos celulares, interacciones inductivas y cambios en la expresión génica, se determina la arquitectura del cuerpo del embrión. Se han descrito varias ondas rápidas de Ca^{+2} intercelulares durante la epibolia, las cuales se mueven desde el tronco con dirección anterior (Webb y Miller, 2003; Créton y cols., 1998).

En pez cebra se han visualizado directamente gradientes de calcio, en los cuales la región ventral de blastodermo exhibe una elevación prolongada de las concentraciones intracelulares de Ca^{+2} en el estado de escudo embrionario.

Después de la epibolia comienzan los movimientos morfogenéticos localizados y actividades propias del período de segmentación. Por ejemplo, se desarrollan los somitos, se hace más prominente el brote de cola, se diferencia la notocorda y aparecen las estructuras primitivas de los futuros órganos. Durante este período también es posible observar cambios en las señales de calcio, siendo éstos más localizados (Webb y Miller, 2003).

Se ha sugerido que el aumento en los niveles intracelulares de calcio libre controla elementos del citoesqueleto durante los procesos morfogenéticos como mitosis, citocinesis, epibolia, formación de somitos y ojos. También se ha demostrado que el Ca^{+2} controla la secreción de proteínas morfogenéticas en una variedad de sistemas celulares pudiendo así regular la secreción de proteínas extracelulares importantes para el desarrollo (Webb y Miller, 2000, 2003). En el desarrollo más tardío, los patrones de Ca^{+2} se encuentran involucrados en movimientos celulares durante la epibolia, inducción neural, regionalización del cerebro, formación de somitos y de la

placa neural, formación de la placa ótica, movimientos musculares y formación del corazón (Lacinová, 2006).

Algunos estudios indican que los gradientes intracelulares de Ca^{+2} e inositol-1,4,5-trisfosfato (IP_3) contribuyen a establecer el eje dorso-ventral (D-V) de varios embriones en desarrollo. Embriones tratados con inhibidores del ciclo de IP durante estadios de 1-16 células, período en el que existe sensibilidad a la inhibición de éste, presentaron fenotipos claramente dorsalizados, mientras que embriones expuestos a los mismos agentes inhibidores en estadios de 128-256 células no presentan ninguna alteración en su fenotipo, desarrollándose igual que los embriones de tipo silvestre. (Westfall y cols., 2003).

Además, resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que la expresión ectópica de los CaV, es decir, en un lugar donde habitualmente no se encuentran, es capaz de inducir características dorsales en el mesoderma ventral. La sobreexpresión de los CaV lleva a una expansión de los territorios dorsales, mientras que su bloqueo impide que las células adquieran las características de destino dorsal (Palma y cols., 2001).

Expresión de CaV en el desarrollo temprano.

Trabajos realizados con anterioridad en nuestro laboratorio proveen evidencias moleculares que sugieren la presencia de CaVs involucrados en procesos del desarrollo temprano, capaces de modular el establecimiento del patrón dorsoventral en los embriones de vertebrados, en este caso del anfibio *Xenopus laevis* (Palma y cols., 2001). Dicho trabajo reporta que subunidades alfa1 de los CaV son expresadas selectivamente en la zona dorsal marginal durante el estadio de gástrula temprana. La expresión de los CaV se correlaciona con niveles de Ca^{+2} intracelulares elevados,

evaluados mediante la fluorescencia del indicador del Ca^{+2} intracelular Fluo-3. La pérdida de la expresión de estos canales conduce a una fuerte dorsalización de la zona marginal ventral e inducción del eje secundario, sin producirse una directa neuralización del ectodermo. Además, la inhibición específica de los CaV mediante el uso del agente bloqueador calcicludina, provoca una ventralización del mesodermo dorsal. Estas evidencias indican que hay canales de Ca^{+2} que regulan el establecimiento del patrón mesodermal, especificando la identidad dorso ventral de las células del mesodermo (Palma y cols., 2001).

Otros estudios de imágenes de Ca^{+2} intracelular revelan patrones transitorios de Ca^{+2} en el ectodermo dorsal, pero no el ventral (Moreau y cols., 2008). Estos incrementos en la concentración intracelular de Ca^{+2} , los cuales ocurren vía la activación de canales de Ca^{+2} sensibles a DHP (familia CaV 1, Tipo L) son necesarios y suficientes para orientar a las células ectodermales hacia un destino neural. Por un lado, los tratamientos que antagonizan el incremento en la concentración de Ca^{+2} intracelular, inhiben la neuralización, mientras que por otro lado, un incremento artificial en la concentración de Ca^{+2} intracelular, sin importar su origen, logra neuralizar el ectodermo. Se han identificado genes blanco de Ca^{+2} expresados tempranamente en territorios neurales, tales como *XIPou2* y *Zic3*. Ambos son factores de transcripción y reguladores neurales primarios, cuya expresión se ve disminuida al usar antagonistas de los CaV sensibles a DHP en *Xenopus*. Otro de estos genes, es *PRMT1* que codifica una arginina metiltransferasa, cuya sobreexpresión aumenta la expresión del marcador proneural *Zic3*, mientras que el uso de morfolino contra su mRNA disminuye la expresión de *Zic3* (Moreau y cols., 2008, Leclerc y cols, 2006). Un fenotipo similar al causado por el morfolino contra *PMRT1* es producido al bloquear los CaV sensibles a DHP (Lecrec y cols, 2000)

Teniendo en cuenta estos antecedentes es posible pensar en la presencia y participación de otros CaVs en procesos tales como la determinación del destino neural del ectodermo y del patrón dorso ventral durante el desarrollo temprano de embriones. Así, es razonable continuar la búsqueda de CaVs aun no descritos o caracterizados que puedan encontrarse presentes durante el periodo de gástrula de embriones vertebrados en desarrollo.

Este trabajo es una aproximación hacia el conocimiento de posibles CaVs presentes en el desarrollo temprano de pez-cebra. Para ello se utilizaron herramientas bioinformáticas que permitieron generar herramientas moleculares capaces de detectar la presencia de los CaVs, tanto a nivel de mRNA como de proteína, en los estadios tempranos del desarrollo de pez-cebra.

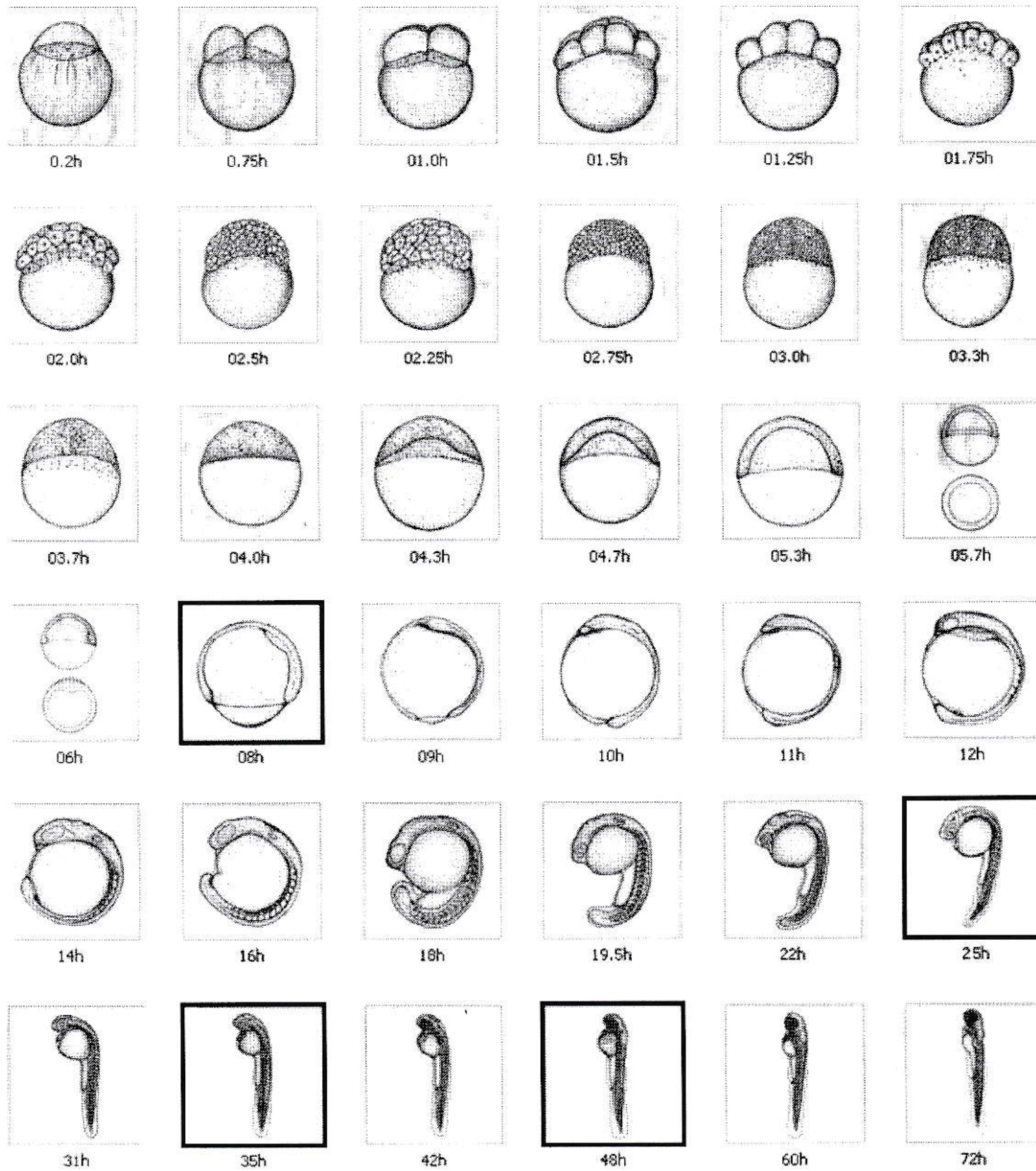


Figura 3. Desarrollo embrionario de pez cebra.

Se aprecian los dibujos de las etapas del desarrollo embrionario de pez-cebra, indicándose las horas post fertilización (hpf) que deben transcurrir para alcanzar los distintos estadios a una temperatura de 28.5 °C. Los estadios utilizados en este trabajo con destacados en un marco negro. La imágenes de los dibujos son capturadas desde el sitio web de la base de datos del modelo pez-cebra ZFIN (www.zfin.org).

Hipótesis.

La expresión de canales de Ca^{+2} activados por voltaje (CaV) varía espacial y temporalmente durante el desarrollo temprano de *Danio rerio*.

Objetivo General.

Identificar secuencias codificantes para CaV en el genoma de *Danio rerio* y caracterizar su patrón de expresión durante el desarrollo temprano del embrión.

Objetivos Específicos.

1. Identificar secuencias homólogas a los CaVs de ratón (*Mus musculus*) en el genoma de pez-cebra (*Danio rerio*), mediante el uso de herramientas bioinformáticas.
2. Identificar el patrón de expresión de las secuencias encontradas durante etapas tempranas del desarrollo de *Danio rerio*, mediante RT-PCR.
3. Determinar el patrón espacial de expresión de mRNA de CaV en embriones, durante sus estadios tempranos de desarrollo, mediante hibridación *In-Situ*.
4. Estudiar la presencia de la proteína correspondiente a la subunidad alfa 1 de los CaV (CaV α 1), durante el desarrollo temprano de *Danio rerio*, mediante inmunofluorescencia.

MATERIALES

Embriones de pez cebra.

Fueron obtenidos desde el vivero del laboratorio del Dr. Miguel Concha (Facultad de Medicina, U de Chile). Proviene de las cruces de individuos wild type. Los peces son mantenidos en acuarios a una temperatura de 28 °C, alimentados tres veces al día con *Artemia salina* (San Francisco, Bay Brand), y sometidos a un ciclo de 12 hrs. de luz y 12 hrs. de oscuridad. Los acuarios poseen un sistema de reciclaje y purificación de agua, la cual debe ser desionizada y es vertida en los acuarios a una concentración salina de 60 mg/L.

Extracción RNA y síntesis cDNA

- Trizol (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU).
- Cloroformo (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Isopropanol (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Etanol 75% (Merck, Darmstadt, Alemania).
- H₂O DEPC (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU).
- Oligo dT (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU).
- dNTP 10 mM (Boehringer, Mannheim, Alemania).
- Amortiguador first strand (Boehringer, Mannheim, Alemania).
- DTT (0,1 M) (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU).
- RNasa OUT (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU).
- Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU).
- RNasa H (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU)

PCR

Amortiguador de PCR 1x	(Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU).
dNTPs 200 μ M	(Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU).
DNA Polimerasa Taq	(Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU).
Agarosa ultrapura	(Fisher Scientific, Bridgewater, New Jersey, EE.UU).
Bromuro de etidio	(GIBCO BRL, Carlsbad, California, EE.UU).

Clonamiento de secuencias homólogas a CaV.

Limpieza de gel Wizard SV Gel and PCR Clean Up System	(Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.).
pGEM-T easy Vector System	(Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.).
QIAGEN Spin Miniprep Kit	(QIAGEN, Stanford, California, EE.UU.).

Bacterias

Escherichia coli, cepa XL1 (Stock laboratorio).

Medios de cultivo para bacterias

Medio LB (Luria Bertani)

Extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, Triptona 1%, ajustado con NaOH 5M a pH 7.0.

Autoclavado y almacenado a 4°C.

En caso de selección bacteriana se agrega: Ampicilina 75 μ g/mL (Boehringer Mannheim, Alemania)

Medio LB sólido (cultivo bacteriano en placas de petri) medio LB más agar a concentración de 15 g/L. Autoclavado, las placas se conservan a 4 °C.

Medio LB sólido X-Gal / IPTG (selección de transformantes en placas petri) medio LB sólido más 40 μ L de solución X-Gal 40 mg/mL en dimetilformamida, agregada sobre la superficie de la placa.

Medio SOC: Bactotripton 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L, Glucosa 20 mM, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, $MgSO_4 \times 7H_2O$ 10 mM y $MgCl_2 \times 6H_2O$ 10 mM.

Generación de Sondas de RNA

Enzimas de Restricción Sac II y Sal I (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.).
 Acetato de sodio (Merck, Darmstadt, Alemania).
 Agarosa (Fisher Scientific, New Jersey, EE.UU.)
 Cloroformo (Merck, Darmstadt, Alemania).
 DEPC, Ditiropirocarbonato (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.)
 DTT, Ditiotreitól (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.).
 Etanol (Merck, Darmstadt, Alemania).
 Fenol (Merck, Darmstadt, Alemania).
 Fenol : Cloroformo : Alcohol isoamílico (Winkler, Santiago, Chile)
 Tampón de transcripción (Tris HCl pH 7,6 200mM, $MgCl_2$ 30mM, spermidina 20mM) (Merck, Darmstadt, Alemania)

Hibridación In-Situ

Agua DEPC (DEPC 0,1% v/v en agua) (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.).
 Ácido maléico (Merck, Darmstadt, Alemania).
 Amortiguador de hibridación (formamida 50%, SSC 5X, RNA de levadura 1 mg/ml, heparina 100 mg/ml, Tween 20 0,1%)

- Anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (Boehringer, Mannheim, Alemania)
- BMBR, Boehringer Mannheim Blocking Reagent (Boehringer, Mannheim, Alemania).
- Citrato de sodio (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Cloruro de magnesio (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Cloruro de sodio (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Formamida (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Glicerol (Winkler, Santiago, Chile).
- Heparina (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.)
- MAB, Tampón de ácido maleico (ácido maleico 100 mM, NaCl 150 Mm pH 7,5).
- MAB/BMBR (BMBR 2% (p/v) en MAB).
- Metanol (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Paraformaldehido (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.).
- PBS 1X (Na_2HPO_4 10 mM, NaH_2PO_4 1,7 mM, NaCl 200 mM, pH 7,4).
- PTw (Tween 20 0,1% (v/v) en PBS 1X).
- RNA de levadura (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.)
- Sustrato BM purple (Roche, Mannheim, Alemania).
- Tris (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Tween 20 (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.).
- Solución BCL (Tris pH 9,5, MgCl_2 , NaCl, Tween 20, H_2O).
- Solución de lavado de sonda 1 (amortiguador de hibridación 75%, SSC 2X).
- Solución de lavado de sonda 2 (amortiguador de hibridación 50%, SSC 2X).
- Solución de lavado de sonda 3 (amortiguador de hibridación 25%, SSC 2X).
- Solución de lavado de sonda 4 (SSC 2X).
- Solución de lavado de sonda 5 (SSC 0,2X).

SSC 20X (NaCl 3 M, citrato de sodio 0,3 M pH 7,4).

Cultivos de Células embrionarias.

Medio de cultivo E3. Para 1 Lt: NaCl 14,33 g, KCl 0,63 g, CaCl₂ x 2H₂O 2,42 g,
MgSO₄ x 7H₂O 4,08 g, Azul de Metileno 0,01%

Medio Leibovitz's L-15 (GIBCO BRL, California, EE.UU.)

Pronasa (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.).

Tripsina-EDTA (GIBCO BRL, California, EE.UU.)

Suero de cabra (GIBCO BRL, California, EE.UU.).

Inmunofluorescencia.

Albúmina de suero bovino (Winkler, Santiago, Chile).

Fluo-4, AM (Molecular Probes, Oregon, EE.UU.).

Solución de lavado (0,25 g de BSA en 50 ml de PBS 1X)

Solución de bloqueo (0,25 g de BSA, 1 ml de suero bovino fetal, completar a 10 ml con
PBS 1X).

Solución de permeabilización (0,05 g de BSA, 50 µl de Triton X-100, completar a
10 ml con PBS 1X).

Solución de inmunofluorescencia (0,25 g d BSA, 50 µl de Triton X-100, completar a
50 ml con PBS 1X).

Suero bovino fetal (GIBCO BRL, California, EE.UU.).

Solución de fijación (Paraformaldehido 4% en PBS)

Solución para 1º lavado de los cobres (PBS 1 X)

Solución para 2º lavado de los cobres (PBS 0.1 X)

MÉTODOS

Búsqueda de secuencias con homología a los CaVs.

Se toman variadas secuencias aminoacídicas de CaVs desde el genoma de ratón (*Mus musculus*) y pez-cebra (*Danio rerio*), accediendo a ellas mediante una búsqueda en la base de datos de NCBI disponible en el sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Una vez obtenidas, se procede a compararlas para generar un consenso para CaV entre ambas especies. Posteriormente se ingresa esta secuencia consenso como consulta contra el genoma de pez-cebra, usando para ello la herramienta de búsqueda BLASTN, utilizando la base de datos "cDNA_*Ab initio*". Se accede a esta base de datos y a sus herramientas virtuales desde el sitio <http://www.ensembl.org>. Las listas de las secuencias que presentan homologías con los CaVs de ratón, son comparadas y analizadas para obtener las secuencias más apropiadas para el estudio. Los criterios se basan en observar las coincidencias que se repiten una mayor cantidad de veces en el total de las comparaciones, que sean secuencias de tipo EST y que posean una longitud, en número de bases, similar a los transcritos codificantes de CaVs conocidos.

Síntesis de partidores.

Las secuencias seleccionadas son ingresadas al programa VECTOR NTI 9.0.0, el cual posee herramientas para la óptima creación de partidores. Se procura obtener partidores que flanqueen segmentos de entre 400 a 500 pares de bases, esto con el fin de evitar problemas con la procesividad de la polimerasa en las futuras reacciones de PCR. Se prefieren los partidores con una T_m entre los 55 y 60 °C. También se tiene

consideración de que el segmento flanqueado por los partidores se encuentre cercano al término del transcrito de interés, para así poder detectar la presencia de mRNA existentes que no hayan sido completamente retro-transcritos en el proceso de síntesis de cDNA. Una vez escogida la mejor pareja de partidores, se envían sus secuencias para ser sintetizadas.

Obtención de embriones.

En recipientes separados por un tabique se ubican macho y hembra. A la mañana siguiente se levanta el tabique y se produce al apareamiento, proceso que dura 5 minutos de manera de tener sincronizados los tiempos de desarrollo en el conjunto de embriones. Los huevos fertilizados caen al fondo del recipiente pasando por una rejilla que los separa de los adultos para cuidar que no sean devorados. Se recolectan con un colador pequeño y se lavan con agua destilada para quitar impurezas antes de pasarlos a placas de Petri.

Mantención de embriones.

Una vez lavados se colocan en placas de Petri de 6 cm de diámetro que contienen Medio E3 (1 litro de medio: 0,63 g KCl, 14,33 g NaCl 2,42 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 4,08 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,01% final de Azul de Metileno).

Las placas se mantienen en incubadoras a 28 °C. Es necesario, a modo de evitar la pigmentación de los embriones, agregar PTU al medio una vez transcurridas las 24 horas post fertilización (hpf).

Recolección de muestras.

Para los análisis por PCR se tomaron peces de dos meses de vida y embriones en estadios de 75% epibolia, 25 y 35 hpf, los cuales son homogenizados en un agente caotrópico como el Trizol y almacenados a -20°C . Para inmunofluorescencia se comienza el protocolo con embriones en 50% epibolia de manera de realizar la técnica en células en cultivo a un estadio equivalente al término de la epibolia. En el caso de la hibridación in-situ se recolectan embriones en 2-4, 16 y 64 células; domo; 50, 75, 100 % epibolia; esbozo de cola; 12, 24,30 y 48 hpf. Los de estadios previos al comienzo de la epibolia son fijados en PAF 4% en PBS por 4 horas a temperatura ambiente. Estadios posteriores son fijados en la misma solución a 4°C durante toda la noche. Al siguiente día deben ser descorionados con pinzas y luego deshidratados con metanol. Se almacenan en metanol 100 % a -20°C .

Extracción de mRNA.

Para peces juveniles (dos meses de edad), se congelan en nitrógeno líquido en un crisol de porcelana previamente enfriado cubierto con papel aluminio, se agrega 1 ml de Trizol y se pulveriza. El polvo es rescatado del papel y puede conservarse en tubos libres de RNAsa a -20°C . Para embriones, se agrupan lotes de entre 60 a 70 y se colocan en un homogenizador con 200 μL de Trizol, se almacena el líquido homogenizado en tubos de 1.5 ml a -20°C . El homogenizado, una vez descongelado, se centrifuga durante 10 minutos a 12000 X g a 4°C . Se extrae el sobrenadante y se traspasa a un tubo de 1,5 ml. Se añaden 0,2 ml de cloroformo por 1 ml de Trizol, se agita vigorosamente en un Vórtex durante 15 segundos, luego se deja incubando a temperatura ambiente durante 3 minutos. Se centrifuga a 12000 X g durante 15 minutos a 4°C y se traspasa la fase acuosa a un nuevo tubo de 1,5 ml. Luego, para

purificar el RNA, se precipita agregando 0,5 ml de isopropanol por cada 1 ml de Trizol usado en la homogenización del tejido. Se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos y enseguida se centrifuga a 12000 X g a 4 °C. El lavado del RNA se comienza descartando el sobrenadante con cuidado de no arrastrar el pellet, se agrega 1 ml de etanol 75 % por cada 1 ml de Trizol usado. La mezcla se somete a agitación en un Vórtex y se centrifuga a 7500 X g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante es descartado y el pellet se deja secar (no completamente) a temperatura ambiente, luego es resuspendido en agua tratada con DEPC, se lleva durante 10 minutos a 56 °C y se resuspende. Posteriormente se mide su concentración mediante espectrofotometría, observando su absorbancia a 280 y 260 nm, usando una dilución de 2:400 de la muestra. La presencia de RNA se observó también mediante electroforesis en gel de agarosa 2 % con bromuro de etidio.

Síntesis de cDNA.

Una vez conocida la concentración de RNA en la muestra se determina el volumen que contenga 5 µg de RNA, cantidad óptima para la reacción de síntesis de cDNA. La mezcla de reacción contiene: 1 µl de oligodT que se usará como partidor; 1 µl de mezcla de NTPs 10 mM; 5 µg de RNA; agua DEPC necesaria para completar un volumen de 12 µl totales. Se lleva a 65 °C durante 5 minutos, enseguida se coloca 2 minutos en hielo. Se agregan a la mezcla 4 µl de Buffer First Strand 5X, 2 µl de DTT 0,1 M, 1 µl de RNAsa Out (inhibidor de ribonucleasas) 40 U/µl, y se lleva por 2 minutos a 42 °C. Luego se agrega 1 µl de la transcriptasa reversa SuperScript II (200U/µl) y se lleva a 42 °C durante 50 minutos, y luego a 70 °C durante 15 minutos. Se agrega 1 µl de RNAsa H 2U/µl y se incuba por 20 minutos a 37 °C. La reacción finaliza llevándola a 4 °C.

PCR.

Las reacciones de amplificación fueron realizadas en conjunto para cada estadio de interés, agrupando todos los tubos correspondientes a cada uno de los pares de partidores, es decir, que la gama de amplicones en estudio son sometidos al mismo programa de temperaturas y tiempos en el termociclador. El programa consta de los siguientes parámetros de tiempo y temperatura: Paso 1: desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos. Paso 2: desnaturalización a 94°C durante 30 segundos. Paso 3: hibridación de 30 segundos a 58 °C. Paso 4: extensión a 72°C durante 30 segundos. Se repite del paso 2 al 4 35 veces. Paso 5: extensión final a 72 ° C durante 10 minutos.

La amplificación de muestras de RNA de peces de 2 meses y embriones de 25 hpf, 75 hpf y de 75 % epibolía se realiza en un volumen total de reacción de 20 µl, el cual se compone de: 1 µl de la solución de cDNA diluido 1:40 desde la reacción de transcripción reversa.; 4 µl Buffer 5X; 1,2 µl MgCl₂ ; 0,4 µl dNTPs 10 mM; 11 µl H₂O bidestilada; 1 µl partidor directo 10 µM; 1 µl partidor reverso 10 µM; y 0,4 µl de polimerasa GoTaq. La amplificación de la muestra de embriones de 35 hfp se realiza en un volumen total de 50 µl con el fin de obtener mayor cantidad de producto del PCR, debido a que los amplicones generados en esta reacción serán clonados. Los reactivos propios de la reacción están en las proporciones extrapolables desde la mezcla anteriormente descrita, salvo la polimerasa, de la cual son suficientes 0,6 µl para un volumen final de 50 µl de reacción, el volumen restante se cubre con H₂O dd.

Como control positivo de la reacción se utilizan partidores para β-actina con cDNA como templado. Como control negativo se usan los mismos partidores pero con agua en reemplazo del templado. Las muestras, una vez realizado el PCR, son cargadas en su totalidad en gel de agarosa 2 % teñido con bromuro de etidio, y se

someten a electroforesis. Como marcador de peso molecular se usa "1 Kb Ladder" de Gibco. La presencia o no de amplicones se observa mediante transiluminador UV. El gel es fotografiado con cámara digital Kodak DC120, conectada a un computador, en el cual se visualiza la imagen por medio del programa ID Image Analysis Software de Kodak.

Extracción y purificación de productos de PCR.

Las bandas observadas en la electroforesis de los productos del PCR con cDNA juveniles de pez-cebra, fueron extraídas y purificadas desde el gel usando el kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean Up System (Promega), siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante. Se escogieron las bandas con tamaño similar al de los amplicones esperados y las que se destacaban por su intensidad, pese a ser de menor tamaño al esperado.

Clonación de productos de PCR.

Una vez extraídos los productos del PCR desde el gel se procede a insertarlos en el vector de clonación pGEM-T Easy, perteneciente al kit de clonamiento pGEM-T easy Vector System de Promega. Los protocolos de inserción del inserto al plásmido y de transformación bacteriana son suministrados por el fabricante. La cepa bacteriana usada es XL-1. Se purificaron los plásmidos de cada uno de los distintos clones obtenidos usando el kit comercial de Promega Wizard Plus SV Minipreps y siguiendo el protocolo del fabricante. La concentración de DNA obtenido de las preparaciones se determinó mediante espectrofotometría, y se analizó la integridad y tamaño del plásmido con el inserto de interés mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % con tinción de bromuro de etidio.

Secuenciación y análisis.

Conocido el éxito de la clonación de los amplicones de interés y su concentración, se envían a secuenciar las muestras (Laragen, Los Angeles, California). Una vez obtenidas las secuencias se procede a su análisis comparativo. Se usa el programa Chromas Lite Version 2.01 para manipular las secuencias y el algoritmo megaBLAST disponible en el sitio web del NCBI, para proceder con su comparación contra la base completa de genomas.

Cultivo de células embrionarias.

De las placas de Petri donde se mantienen los embriones, se escogieron aproximadamente 100 de éstos, los cuales se encontraban saludables, condición apreciada por un correcto desarrollo de los mismos. Los embriones escogidos fueron traspasados a una nueva placa de Petri estéril con medio E3, en la cual se llevaron a cabo 10 lavados, cada uno con 2 ml del mismo medio estéril. Luego fueron transferidos a una placa que contiene una película de gel de agarosa 2% en medio E3. Una vez realizado esto, se quitó lo mas posible el medio E3 traspasado junto a los embriones y se agregó 1 ml de solución de pronasa (2 mg/ml) con el fin de remover fácilmente el corion. Se incubó con la pronasa durante 10 minutos a 31 °C. Transcurrido el tiempo, inmediatamente se agregó aproximadamente 5 ml de E3 para diluir rápidamente la pronasa, y usando distintas pipetas Pasteur de vidrio, cada vez, se transfirieron los embriones por 3 placas de agarosa. Después del último lavado se transfirieron los embriones a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, se eliminó el líquido y se agregó 1 ml de una solución de tripsina/EDTA (0,25%/0,02%) precalentada y durante 5 minutos se incubó a 37°C para disgregar las células del embrión. Se adicionaron 100 µl de suero de cabra para inactivar la tripsina y se centrifugó a 1000 x g durante 30 minutos

a 4°C. Las células se resuspendieron en 500 µl de medio libre de suero, se colocaron sobre un cubreobjeto previamente tratado con poli-lisina y se incubó a 28 °C por aproximadamente 2,5 horas antes de ser fijadas con PAF 4%.

Inmunofluorescencia.

Una vez que las células de cultivo alcanzaron el desarrollo que se deseaba se colocaron los cubreobjetos con las células adheridas un placas de 24 pocillos y se lavaron 1 vez con 1 ml de PBS 1X. Luego se incubaron con 200 µl de PAF 4% durante 10 minutos y 2 veces con 200 µl de NH₄Cl 1M durante 10 minutos, luego se incubaron durante 10 minutos con 200 µl de solución de bloqueo y finalmente con 200 µl de solución de permeabilización durante 10 minutos. Todas estas etapas se realizaron a temperatura ambiente sin agitación. Se agregó el anticuerpo primario, diluido en solución de inmunofluorescencia durante 1 hr. a temperatura ambiente. Una vez concluida la incubación se realizaron 3 lavados de 10 minutos con 400 µl de solución de inmunofluorescencia sin agitación. Desde esta etapa en adelante es necesario proteger las preaparaciones de la luz. Luego se incubó con anticuerpo secundario, diluido en solución de inmunofluorescencia durante 1 hora a temperatura ambiente. Nuevamente se hicieron 3 lavados, de 10 minutos, cada uno, a temperatura ambiente con agitación, usando 400 µl solución de inmunofluorescencia. Se sumergieron 5 veces los cubreobjetos en PBS 1X al 5% y se eliminó el exceso de agua con papel absorbente. Sobre un portaobjeto se colocaron 3 µl de solución de montaje y sobre esto se colocó el cubreobjeto con las células hacia abajo, se sellaron los bordes con esmalte y se guardaron las preaparaciones protegidas de la luz a 4°C. El anticuerpo utilizado para la detección es Anti-Pan alfa1 CaV en una dilución 1:1000 y es generado por Alomone Labs. El anticuerpo secundario anti IgG de conejo es Alexa Fluor 488 que

posee el fluoróforo FIT-C, el cual se usó en una dilución 1:500. Los ensayos de preabsorción del anticuerpo primario con su antígeno específico, se realizaron según indicaciones de fabricante (Alomone Labs).

Obtención de imágenes con microscopía confocal.

La adquisición de imágenes para realizar los estudios de detección de la subunidad alfa1 mediante inmunofluorescencia, se realizaron mediante el uso de microscopía confocal LSM 5 PASCAL (Carl Zeiss), utilizando el objetivo Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC. Las dimensiones de las imágenes y los parámetros de adquisición se mantienen constantes para efectos de comparación en el caso de los ensayos de detección normal v/s control de Ab primario, y en el de absorción v/s su respectivo control. Las imágenes de células que presentan mayor aumento fueron producto de la adquisición usando el zoom digital del software. La longitud de onda de excitación del fluoróforo FIT-C es de 488 nm.

Síntesis de sondas de RNA.

Se prepararon sondas de RNA antisentido modificadas por la incorporación de DIG-UTP. Las sondas se obtuvieron usando como sustrato de partida el plásmido digerido con una enzima de restricción de corte único para linearizar el vector río arriba de la secuencia de interés. Con el fin de sintetizar la hebra antisentido complementaria al mensajero endógeno que se desea detectar, se usó el promotor ubicado río abajo de la secuencia de interés.

El procedimiento de transcripción in vitro se desarrolló agregando 1 µg del producto linearizado en una mezcla de reacción que contiene: 2 µl de amortiguador de

transcripción 10x, 2 μ l de la mezcla de NTPs (ATP 10 mM, CTP 10 mM, GTP 10 mM, UTP 6,5 mM, DIG-UTP 3,5 mM), 1 μ l enzima T7 o SP6 y H₂O DEPC para completar un volumen final de 20 μ l. Se incubó la reacción a 37°C durante 2 horas, se agregó 1 μ l de DNasa I y se incubó a 37°C durante 30 minutos y se añadió 30 μ l de H₂O DEPC. Luego se agregaron 5 μ l de acetato de amonio 5M y 3 volúmenes de etanol 100% y se precipitó a -20°C durante 30 minutos. Se centrifugó a máxima velocidad por 15 minutos a 4°C. Cuidadosamente se removió el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol 70% libre de RNAsa. La sonda se guardó a -80°C.

Hibridación *In-Situ*.

Los embriones almacenados en metanol fueron rehidratados mediante lavados sucesivos durante 5 minutos, en 1 ml de MeOH 75%, 50% y 25% v/v y finalmente en 4 lavados de 5 minutos usando 1 ml de PTw.

Los embriones de más de 24 horas requirieron un tratamiento previo consistente en una digestión con 10 μ g/ml de proteinasa K en PTw a temperatura ambiente, luego los embriones se lavaron con 1 ml de PTw, se fijaron nuevamente en PAF 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente y lavados con PTw. Los embriones se prehibridaron por al menos 2 horas a 65°C en 300 μ l de amortiguador Hyb(-), para lo cual los tubos se dispusieron horizontalmente. Se prepararon 300 μ l, por tubo, del amortiguador de hibridación con la sonda correspondiente, la que se dejó toda la noche a 65°C, con los tubos dispuestos horizontalmente. El segundo día se recuperó la sonda (para reutilizarla hasta 3 veces). Se realizaron lavados de 5 minutos cada uno con 1 ml de solución de lavado de sonda 1, 2 y 3, de 15 minutos con 1 ml de la solución de lavado 4 y finalmente se lavó 3 veces durante 25 minutos con 1 ml de la solución 5. Todo este procedimiento se realizó a 65°C con los tubos en posición horizontal. A continuación se

lavaron los embriones a temperatura ambiente con 1 ml de SSC 0,2x/ MAB (75%, 50% y 25% v/v), luego se equilibraron en 1 ml de MAB 2 veces durante 5 minutos. Se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con MAB/BMBR por al menos 3 horas a temperatura ambiente y se incubaron con anticuerpo anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina a 4°C durante toda la noche (dilución del anticuerpo 1:5000 en solución MAB/BMBR). El tercer día se recuperó el anticuerpo (se reutilizó 2-3 veces) y se lavó 8 veces en 1 ml de MAB a temperatura ambiente. Fue necesario equilibrar los embriones en amortiguador BCL. Se agregó 300 µl de sustrato BM purple y se incubó en oscuridad sin agitación a temperatura ambiente hasta que la reacción estuvo completa. Se detuvo la reacción lavando con PTw. Se fijaron los embriones en PAF 4% durante 1 hora a temperatura ambiente y se guardaron en glicerol 70% a 4°C.

RESULTADOS

Conservación aminoacídica entre CaV α 1 de ratón y pez-cebra.

Con el propósito de analizar el grado de conservación de la subunidad alfa1 de CaV, se realizó una recopilación de secuencias aminoacídicas correspondientes a la subunidad alfa-1 de CaV (CaV α 1) de ratón y pez-cebra, desde la base de datos disponible en el sitio web del NCBI (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.org). Se escogieron las correspondientes a cada tipo de CaV en ambas especies. Todas las secuencias escogidas pertenecientes a ratón poseen evidencia experimental de su expresión, en cambio algunas provenientes de pez-cebra solo han sido determinadas computacionalmente a través del método de predicción de genes GNOMON, asignándoles el calificativo de “predichas”. Las secuencias escogidas y sus códigos de acceso en la base de datos se enlistan en la Tabla 1. Estas fueron ingresadas en la base de datos de péptidos del programa Vector NTI para su análisis filogenético y de conservación.

Al comparar las secuencias de los distintos tipos de CaV dentro de cada especie, se genera un dendrograma para ratón y pez-cebra (Figura 4A), donde se aprecian tres grupos principales de similar apariencia al descrito en la literatura (Figura 2). También se obtiene un gráfico del grado de conservación aminoacídico a lo largo de la secuencia, señalando las zonas conservadas como sectores con una alta densidad de picos azules (Figura 4B). Se observa que el patrón de conservación es similar entre ratón y pez-cebra, indicando similitud en cuanto a la distribución de las zonas conservadas dentro de la secuencia de CaV α 1.

Tabla 1. Códigos de secuencias aminoacídicas escogidas de CaV de ratón y pez-cebra.

Las distintos tipos de CaV aparecen enlistados junto a su correspondiente código de acceso en la base de datos de NCBI. Para pez-cebra también se informa el cromosoma en que se ubica.

Tipo	Alias	Ratón <i>Mus musculus</i>	Pez-cebra <i>Danio rerio</i>	en pez cebra ubicado en Cromosoma :
CaV1.1	CACNA1S	Q02789	NP_999891	8
CaV1.2	CACNA1C	Q01815	NP_571975	4
CaV1.3	CACNA1D	Q99246	NP_982351	11
CaV1.4	CACNA1F	Q9JIS7	XP_001333514 *	8
CaV 2.1	CACNA1A	P97445	XP_690548 *	3
CaV 2.2	CACNA1B	O55017	NP_001108020	5
CaV2.3	CACNA1E	Q61290	XP_001920777 *	8
CaV3.1	CACNA1G	NP_033913	XP_001920550 *	12
CaV3.2	CACNA1H	O88427	XR_029041 **	3
CaV3.3	CACNA1I	NP_001037773	XP_001919547 *	11

(*) Secuencia aminoacídica predicha mediante sistema de predicción GNOMN

(**) No fue posible encontrar alguna secuencia aminoacídica, predicha o no, de CaV3.2. se informa la secuencia nucleotídica, cuya predicción transcripcional es similar a CaV3.3 de rata

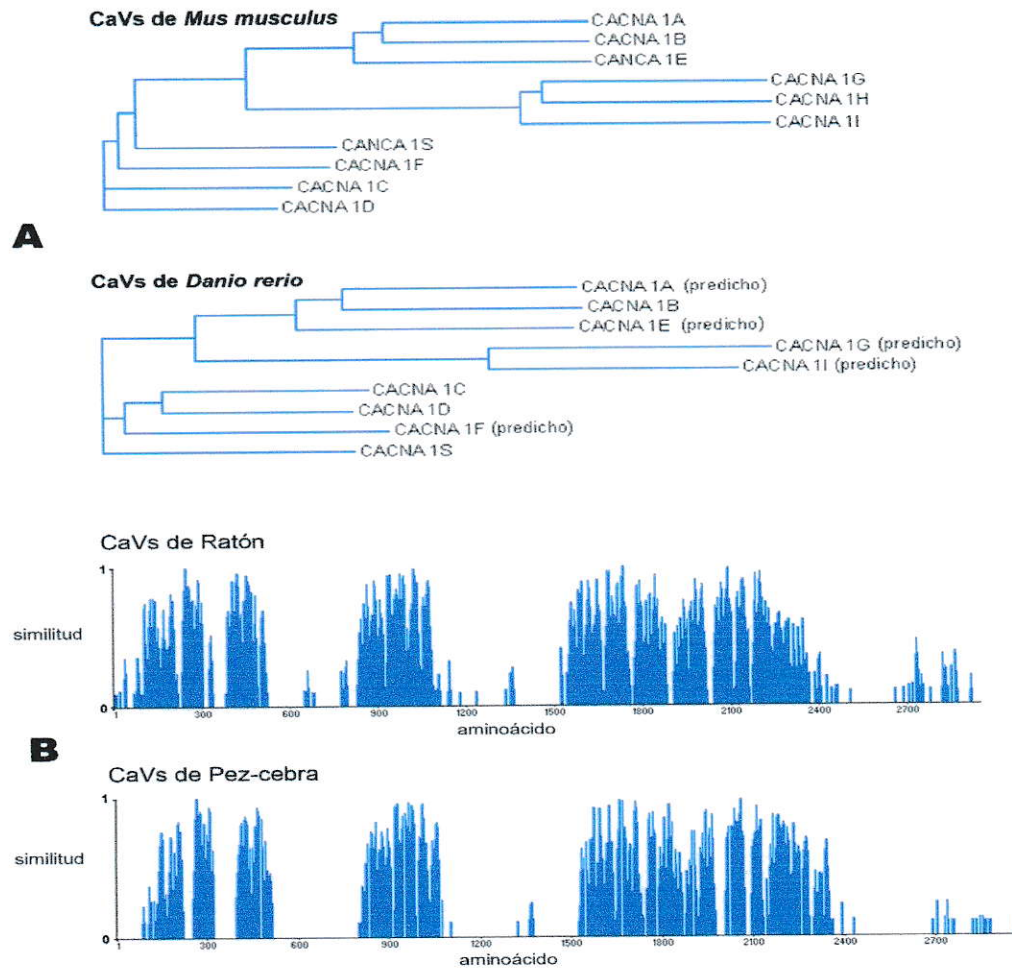


Figura 4. Análisis filogenético y comparativo de las secuencias aminoacídicas de los CaV de ratón (*Mus musculus*) y pez-cebra (*Danio rerio*).

(A) Las secuencias escogidas correspondientes a la subunidad $\alpha 1$ de CaV son ordenadas en un dendrograma filogenético, donde se distinguen los grupos de CaV neuronales, del tipo L y del tipo T, ya descritas antes en la literatura (Figura 1). El análisis incluye la secuencia completa de cada CaV $\alpha 1$ escogida. (B) Los gráficos representan el grado de similitud de las secuencias de CaV $\alpha 1$ de cada especie alineadas entre sí, generando un patrón de conservación aminoacídica para ratón y pez cebra, los cuales son de similar apariencia entre sí. Las zonas conservadas de CaV $\alpha 1$ se distinguen en forma de picos más altos en la gráfica. Cada línea vertical azul representa una posición comparada entre los CaV de cada especie, y su altura representa el grado de conservación de aquella posición. El eje horizontal indica las posiciones de los aminoácidos a lo largo de la proteína. El eje vertical indica como 1 y 0, el valor de total y ninguna similitud, respectivamente. El algoritmo usado en (A) es Neighbor Joining. La matriz de sustitución usada en (B) es blosum62mt2 para proteínas.

Para observar la conservación de CaV α 1 entre ratón y pez-cebra, se obtuvo la secuencia consenso de entre las distintas isoformas para cada especie (Figura 5) y se alinearon entre sí (Figura 6). De este alineamiento se obtuvo la secuencia consenso que representa los aminoácidos conservados a través de las distintos tipos de alfa1 CaV entre ratón y pez-cebra (Figura 7), la cual se utilizó posteriormente para encontrar secuencias homólogas en el genoma de pez-cebra.

Secuencias homólogas a CaV en el genoma de pez cebra.

A través del sitio web del proyecto Ensamble (www.ensembl.org), dedicado a generar bases de datos genómicas de distintas especies de eucariotas, se ingresó al genoma de pez-cebra en su versión 7 de ensamblaje (Zv7) publicada el 13 de Julio del 2007. Mediante la herramienta básica de búsqueda por alineamiento local BLAST (en inglés: Basic Local Alignment Search Tool), disponible en el sitio de Ensembl, se realizó una búsqueda de secuencias nucleotídicas homólogas al consenso de CaV α 1 obtenido entre ratón y pez-cebra. Para ello se escogió la función TBLASTN, puesto que permite encontrar en el genoma secuencias nucleotídicas homólogas a una secuencia peptídica de consulta.

La búsqueda se llevó a cabo contra la base de datos denominada "cDNA_*Ab initio*", la cual permite el acceso a todos los transcritos encontrados en el genoma mediante los algoritmos de predicción génica SNAP y Genscan, y que no necesariamente presentan evidencia experimental adicional a la predicción computacional.

A

1	G	G	S	R	R																																																										
101	R	L	F	C	IV	VE	P	P	F	F	E	I	I	F	E	K	I	A	G	F	H	Y	L	R	N	G	N	L																																			
201	D	F	I	V	G	L	D	ALR	AVR	VR	LR	PLR	LR	L	SI	KAM	P	LL	I	LL	FF	VI	IF	AI	IGL	EL	GK	H																																			
301	CF	E P PC										T	CR	GM	GFN																																																
401	G	ITN	F	D	N	I	F	A	L	T	V	QC	I	T	H	G	W	Y	F	I	L	I	G	S	F	F	L	L	V	L	G	V	L	S	KE	R	R	F	O	K	L	R	Q	Q																			
501	E	E	E	L	G	Y	W	I	E																																																						
601	R	S	T																																																												
701	R	K	R	R																																																											
801	R	R	V	K	S	F	V	V	L	N	T	A	E	H	H	O	P	U	L	T	L	A	N	V	L	F	E	H	L	L	K	N	V	L	G	Y	F																										
901	S	F	N	F	D	V	V	G	S	I	E	G	I	S	V	L	R	L	R	I	F	K	T	R	U	S	L	M	V	S	L	N	S	M	S	I	A	S	L	L	L	F	L	I	I	F	S	L	L	G	H	L	F	G	G	F	N	F					
1001	D	T	P	R	F	D	F	P	A	I	T	V	Q	I	L	T	G	E	D	N	N	V	N	G	I	S	G	G	G	M	Y	F	I	L	F	G	N	Y	L	L	N	V	F	L	A	I	A	V	D	N	L	A	L	T	E	K							
1101	S																																																														
1201	E	E																																																													
1301																																																															
1401	E	P	E	S	S	F	I	F	S	P	T	R	C	H	I	F	I	L	F	I	L	S	S	I	L	A	A	E	D	P	I																																
1501	S	R	N	L	X	Y	X	D	Y	F	T	E	M	K	M	G	L	H	G	A	R	M	N	L	D	L	V	V	S	L	F	I	V	K	L	E	V	L	R	V	L	R	P	L	I	R	A	G	L	K	V	V											
1701	C	V	S	L	I	G	N	I	I	V	L	F	F	I	F	A	I	G	V	L	F	R	G	K	F	C	D	K	C	G	Y	R	W	F	F	D	N	V	L	A	L	L	F	I	V	S	T	E	G	M	P												
1801	L	Y	D	A	E	D	G	P	N	R	E	M	S	I	F	F	I	Y	I	F	F	N	I	F	V	G	V	I	X	T	Q	E	G	E	C	L	K	N	E	R	C	A	K	A	R	P																	
1901	L	R	V	P	N	Q	Y	X	W	V	S	F	E	Y	I	I	L	N	T	L	M	H	V	Q	A	L	L	N	F	T	F	E	V	L	K	I	A	F	G	Y	F	D	M	N	F	D	I	V															
2001	G	S	I	D	I	L	E	I	I	F	R	L	F	R	A	R	L	K	L	G	G	I	R	L	L	W	T	F	Q	S	F	A	L	P	V	L	L	I	M	L	F	F	I	Y	A	I	G	H	Q	F	G												
2101	D	I	N	R	H	N	N	F	T	Q	A	L	L	L	F	R	A	T	G	E	A	M	I	N	L	C	L	C	D	P	S	C	G	F	A	Y	F	V	S	F	L	C	F	L	N	L	F	V	A	V	I												
2201	M	D	N	F	D	Y	L	T	R	D	S	I	L	G	P	H	L	D	E	F	R	M	E	Y	D	P	A	G	R	I	D	L	P	P	L	G	K	C	P	R	V	A	K	R	L	V	M	N	P	D	I	V	F	T	L	A	L	R	T	A	L	I	K
2301	Q	E	L	R	I	W	S	K	L	D	P	T	V	G	K	Y	A	I																																													
2401	D	P																																																													
2501	R																																																														
2601	P	P	S	P	P	S	P	P																																																							
2701	P	G	S	L	G	L	D	A	D	A																																																					
2801	S	L	G	L	D	A	D	A																																																							
2901																																																															

B

1	P	R	L	F	N	R	E	V	F	E	I	L	T	I	A	N	C	V	L	A	P	P	D	L	E	E	F	I	F	E	K	I	A	G	F	H																								
101	Y	L	R	N	G	N	L	D	F	I	V	G	L	D	ALR	AVR	VR	LR	PLR	LR	L	SI	KAM	P	LL	I	LL	FF	VI	IF	AI	IGL	EL	GK	H	T	C																							
201	VI	IF	AI	IGL	EL	GK	H	T	C																																																			
301	G	V	W	G	P	N	I	F	D	N	I	F	A	L	T	V	QC	I	T	H	G	W	Y	F	I	L	I	G	S	F	F	L	L	V	L	G	V	L	S	KE	R	R	F	O	K	L	R	Q	Q	E										
401	L	G	Y	W	I	E																																																						
501	L	G	Y	W	I	E																																																						
601	R	S	T																																																									
701	R	K	R	R																																																								
801	K	R	R	R	R	R	V	K	S	F	V	V	L	V	L	N	T	A	E	H	H	O	P	U	L	T	L	A	N	V	L	L	F	E	H	L	K	N	V	L	G	Y	F	S	F	N	F	D	C	V	V									
901	G	S	I	E	G	I	S	V	L	R	L	L	R	I	F	K	T	R	Y	S	L	N	L	V	S	L	N	S	M	K	S	I	A	S	L	L	L	F	L	I	I	F	S	L	L	G	H	L	F	G	G	K	F	N	F					
1001	P	A	I	T	V	F	Q	I	L	T	G	E	D	N	N	V	N	G	I	S	G	G	G	M	Y	F	I	L	F	G	N	Y	L	L	N	V	F	L	A	I	A	V	D	N	L	A	L	T	E	K										
1101	A																																																											
1201	E	G	G	R																																																								
1301	R	E	G	G	R																																																							
1401	P	P	S	F	I	F	S	P	T	R	C	H	I	H	F	I	L	F	I	L	S	S	I	L	A	A	E	D	P	I	S	R	N	L	Y	D	V	F	T	V	T																			
1501	E	M	K	M	G	L	H	G	S	Y	R	M	N	I	L	D	V	V	S	L	V	F	S	I	S	V	K	L	R	V	L	R	P	L	R	I	R	A	P	G	L	K	V	V	C	V	K	I	G	N	I	I	V	L						
1701	F	F	A	I	G	V	Q	L	F	R	G	K	F	F	Y	C	D	K	Y	R	W	D	F	N	D	N	V	L	A	L	L	F	T	V	S	T	E	G	M	P	L	Y	D	A	E	D	G	P	N	Y	R									
1801	E	M	S	I	F	F	I	I	Y	I	A	F	F	N	I	F	V	G	V	I	T	F	Q	E	G	C	E	L	K	N	R	C	A	A	P	L	R	Y	P	N	Q	Y	W	V	S	F	E	Y	L	I										
1901	L	N	T	L	M	H	Q	L	K	L	N	F	T	L	F	E	I	L	K	L	I	A	F	G	Y	F	D	A	W	N	F	D	I	V	L	G	S	I	D	I	E																			
2001	I	F	R	L	F	R	R	L	K	L	G	E	G	I	R	L	L	U	T	F	V	Q	S	F	A	L	P	V	L	L	I	A	M	L	F	F	I	Y	A	I	G	H	Q	F	G															
2101	F	T	F	Q	A	L	L	F	R	A	T	G	E	W	I	N	L	A	C	L	C	D	S	C	G	S	F	A	Y	F	V	S	F	L	C	F	L	N	L	F	V	A	V	I	M	D	N	F	E	L	T	R	D	S	I	L	G	P	H	L
2201	D	E	F	R	I	V	E	Y	D	E	A	G	R	I	K	L	D	H	L	R	O	P	L	G	K	C	P	R	V	A	K	R	L	V	M	N	M	P	D	T	V	F	N	T	L	A	L	R	T	A	L	I	Q							
2301	ELR	I	U	S	L	D	V	P	E	T	V	G	K	Y	A	L	I	Y	E	PE																																								
2401	R																																																											
2501	P																																																											
2601	P																																																											
2701	R	V	S	P																																																								
2801	P	P	L	L	E																																																							
2901	C																																																											

Figura 5. Posiciones aminoacídicas idénticas de las secuencias de CaV α 1 escogidas. Se comparan las secuencias de la subunidad α 1 de CaV de cada especie entre sí para obtener el consenso aminoacídico de CaV α 1 de cada especie (ratón y pez-cebra). Los aminoácidos del consenso aparecen destacados con respecto a las posiciones poco conservadas indicadas por una X. Se puede apreciar la distribución de las zonas conservadas a lo largo de la secuencia peptídica de CaV α 1. (A) secuencia de consenso de CaV α 1 de ratón. (B) secuencia de consenso de CaV α 1 de pez-cebra.

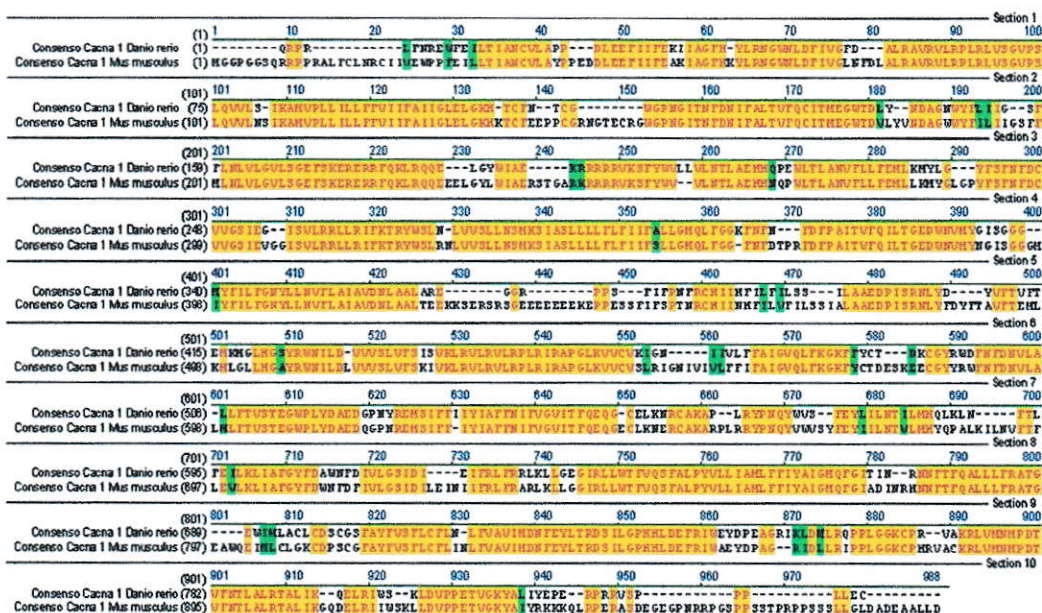


Figura 6. Alineamiento entre las secuencias de consenso aminoacídico de CaV α 1 de *Mus musculus* y *Danio rerio*.

Se observa una alta identidad entre ambas secuencias consenso, representada por bloques amarillos con letras en rojo. Los bloques verdes representan aminoácidos similares.

```

1 RPLFILTIAN CVLAPDLEEF IFEIAGFHY LRNGWNLDI VGALRAVRVL
51 RPLRLVSGVP SLOVVLKAM VPLLILLFFV IFAIIGLEL GKHTCFCGWG
101 PNGITNFDNI FALTVFQCIT MEGWTDLNDI GUYFIIIFLN LVLGVLSGEF
151 SKERERERFQK LRQOEWIAEK KRRRRVKSFY WVVNLTAEH HNULTLANVF
201 LFFENLGYFS FNFDCVVGSI EISVLRLLR IFKTRYWSSL VVSLLSMSKS
251 IASLLLLFLF IIFALLGHL FGGFNFFDFP AITVFQILT EDUNVYGGI
301 YFILFGNYLL NVFLAIAVDN LAALEGPPPR CHIIIIILAAE DPISRNLVVF
351 TMLHGAYRWN ILDVVVSLVF SVKLRVLRVL RPLRIRAPGL KVVCVIIFA
401 IGVQLFKGKF FDCGYFNFDN VLALLFTVST EGWPLYDAED REMSIFFIYI
451 AFFNIFVGV I TFQEQGRCR KARYPNOYFE YIILNTILMH FTEILKLI AF
501 GYFDIVLGS I DIIFRLFR LG IRLLTFTVQS FALPYVLLIA MLFFIYAIGH
551 QFGINNFTFQ ALLLFRATGE ILCDFAYFVS FLCFLLFVAV IMDNFEYLTR
601 DSILGPHHLD EFRIWAGKID LLRPPLGGKC PKRLVMNMPD TVFNLTALRT
651 ALIKELRILD VPPETVGKYA IRPRSPPLL

```

Figura 7. Secuencia de consenso aminoacídico de la subunidad α 1 entre ratón y pez-cebra. La secuencia de consenso entre ambas especies se genera comparando los consensos previamente obtenidos de ambas especies, excluyendo para ello, los espacios de las zonas poco conservadas. Esta secuencia será utilizada para la búsqueda de secuencias homólogas presentes en el genoma del pez-cebra.

Se obtuvo una imagen que muestra el cariotipo del pez-cebra destacando las locaciones cromosómicas en que se encuentran las zonas homólogas a la secuencia consenso ingresada como consulta en el BLAST (Figura 8). También se obtuvo una serie de secuencias en el genoma de pez-cebra que presentan distinto grado de homología a la secuencia consenso de $\alpha 1$ ingresada, y que se muestran en la figura 9. De las secuencias homólogas, se escogieron las que presentan más alto puntaje de alineamiento, que se encontraran repetidas veces, y que además el ensamble de los alineamientos de cada coincidencia repetida abarcara la mayor longitud de la secuencia consenso de consulta. Una vez seleccionadas, se generaron partidores específicos para la detección de los mRNA producto de estas secuencias homólogas encontradas en el genoma de pez-cebra, y se realizaron experimentos de RT-PCR en diferentes estadios del desarrollo para observar su expresión.

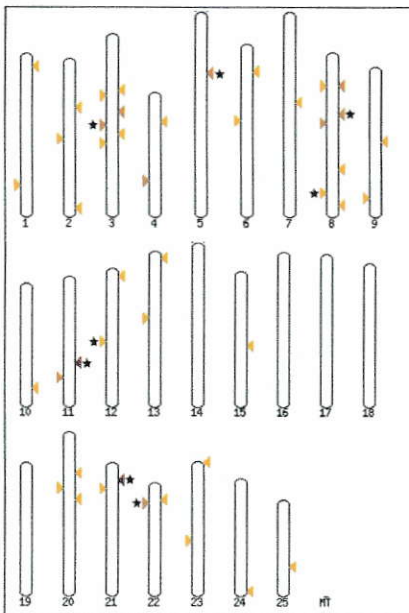


Figura 8. Locación cromosómica de secuencias homólogas al consenso de $\alpha 1$ en el genoma de pez-cebra.

El diagrama muestra como cabezas de flecha coloreadas las posiciones en los cromosomas de las coincidencias generadas mediante BLAST, al comparar el consenso de $\alpha 1$ con el genoma de pez-cebra. El color rojo denota mayor identidad en el alineamiento. El diagrama es generado mediante BLAST en el sitio www.ensembl.org. Las estrellas indican las secuencias que se lograron detectar posteriormente mediante RT-PCR en este estudio.

sec consulta			sec coincidente			Cromosoma				estadísticas				
inicio	fin	Ori	nombre	inicio	fin	Ori	nombre	inicio	fin	Ori	puntj.	E-val	%ID	long.
3	209	+	GENSCAN00000017802	1251	1480	+	Chr:5	21097949	21111084	-	777	3.4e-71	54.98	251
5	215	+	GENSCAN000000038738	1302	1526	+	Chr:3	31571124	31585692	-	646	1.9e-57	49.02	255
129	225	+	GENSCAN000000013387	1686	1812	+	Chr:11	29841425	29853352	-	566	1.4e-67	65.35	127
27	232	+	GENSCAN000000031441	197	420	+	No data				566	5.3e-49	42.97	249
9	287	+	GENSCAN000000015959	958	1261	+	Chr:8	39999402	40009452	+	551	1.2e-47	37.39	329
68	232	+	GENSCAN000000040630	1132	1327	+	Chr:8	24208040	24215854	+	546	3.6e-49	46.89	209
27	232	+	GENSCAN000000017271	1174	1397	+	Chr:22	7281969	7289146	-	542	1.1e-46	43.43	251
149	232	+	GENSCAN000000017802	1401	1514	+	Chr:5	21093620	21101713	-	534	4.7e-50	67.54	114
147	246	+	GENSCAN000000005484	1133	1252	+	Chr:21	6333390	6345572	-	517	1.9e-80	62.60	123
149	246	+	GENSCAN000000038738	1435	1562	+	Chr:3	31567386	31575393	-	514	3.6e-48	60.16	128
32	151	+	GENSCAN000000013387	1577	1711	+	Chr:11	29851231	29861639	-	478	1.0e-38	57.64	144
59	279	+	GENSCAN000000011821	1711	1938	+	Chr:8	21331870	21334709	+	463	5.5e-40	42.64	265
28	280	+	GENSCAN000000041805	1423	1674	+	Chr:8	48226653	48237328	+	450	1.6e-36	34.64	306
59	183	+	GENSCAN000000018955	16	167	+	Chr:4	30244613	30246112	-	445	4.3e-37	50.00	162
47	205	+	GENSCAN000000023446	1088	1263	+	Chr:11	34840677	34859788	-	413	1.5e-33	41.50	200
28	207	+	GENSCAN000000020048	1355	1537	+	Chr:8	11417480	11427702	+	367	6.8e-30	36.87	217
68	156	+	GENSCAN000000005484	1032	1132	+	Chr:21	6345573	6355506	-	358	1.9e-80	58.88	107
5	121	+	GENSCAN000000023446	1004	1146	+	Chr:11	34843028	34866252	-	346	3.1e-27	48.67	150
3	163	+	GENSCAN000000015959	927	1105	+	Chr:8	39999309	40003346	+	280	1.2e-19	35.00	200
55	196	+	GENSCAN000000018739	1472	1642	+	Chr:1	4726093	4732029	-	253	4.8e-18	39.66	179
3	85	+	GENSCAN000000013387	1513	1618	+	Chr:11	29855000	29864167	-	244	1.4e-67	46.02	113
204	251	+	GENSCAN000000011821	1905	1975	+	Chr:8	21334521	21335088	+	241	3.4e-21	64.79	71
17	232	+	GENSCAN000000012003	1434	1668	+	Chr:9	45046609	45047313	-	233	8.5e-15	28.19	259
55	210	+	GENSCAN000000000885	1698	1855	+	Chr:3	37747859	37753614	+	229	2.9e-17	35.11	188
55	143	+	GENSCAN000000026994	1127	1245	+	No data				221	6.1e-15	42.98	121
6	153	+	GENSCAN000000004386	1480	1647	+	Chr:6	9267207	9269237	-	218	2.9e-28	36.02	186
12	82	+	GENSCAN000000018541	1011	1108	+	Chr:4	30253638	30256382	-	214	4.9e-13	44.44	99
15	99	+	GENSCAN000000041805	1319	1427	+	Chr:8	48223597	48226667	+	212	1.4e-12	43.36	113
15	99	+	GENSCAN000000020048	1251	1359	+	Chr:8	11414549	11417494	+	212	1.3e-12	43.36	113
12	247	+	GENSCAN000000020543	167	378	+	Chr:9	25571532	25621656	-	211	1.1e-12	27.91	258
4	185	+	GENSCAN000000015171	1508	1710	+	Chr:12	25548154	25567408	-	211	2.0e-12	32.17	230
147	232	+	GENSCAN000000004386	1660	1761	+	Chr:6	9266665	9267170	-	210	2.9e-28	34.26	108
147	232	+	GENSCAN000000034189	940	1041	+	No data				205	7.8e-26	32.08	106
28	264	+	GENSCAN000000040630	470	699	+	Chr:8	24189287	24195472	+	202	1.2e-11	30.69	277
1	187	+	GENSCAN000000015171	629	820	+	Chr:12	25663079	25669974	-	196	7.1e-11	28.12	224
32	151	+	GENSCAN000000034189	791	929	+	No data				195	7.8e-26	35.29	153
7	238	+	GENSCAN00000001407	191	428	+	Chr:24	38394510	38406987	-	191	3.8e-11	27.34	278
147	262	+	GENSCAN000000015545	1635	1748	+	Chr:6	26368845	26369186	-	190	1.9e-15	30.53	131
53	177	+	GENSCAN000000026994	839	975	+	No data				189	9.7e-12	32.24	152
12	232	+	GENSCAN000000010928	1353	1593	+	Chr:2	51429183	51430189	-	187	4.5e-10	26.85	257

Figura 9. Secuencias homólogas a CaV α 1 en el genoma de pez-cebra.

La tabla enlista las coincidencias encontradas en el genoma de pez-cebra usando como secuencia de consulta el consenso de la subunidad α 1 de CaV obtenido de entre ratón y pez-cebra. Las coincidencias se muestran en orden de mayor a menor puntaje de apareamiento. Las locaciones se muestran como posiciones en el ensamblaje genómico, y se indica el inicio y término del apareamiento en la secuencia consulta y en las secuencias coincidentes encontradas. La columna de parámetros estadísticos muestra el puntaje, el E-value, el porcentaje de identidad y la longitud del alineamiento. La lista es generada mediante BLASTN en el sitio www.ensembl.org, y solo muestra las primeras 40 coincidencias, dentro de las cuales se encuentran las secuencias identificadas en este estudio marcadas en rojo.

Tabla 2. Secuencia de partidores utilizados en RT-PCR.

SH	Partidores	pb	SH	Partidores	pb
1	(D) CTTGGATTTGGGAAGCTCTGTCCTC (R) TCCCCATTTCAGGATGCCATCT	548	7	(D) TTTCTGAGTCAGCCACTGTCCGA (R) TCTGATCCTGACTCTGTTTGC GCA	515
2	(D) ATCAACCACAACCCCTGGATGCT (R) GGATTGATGGGAAGTGAAGCGCTTA	542	8	(D) ATGTACGATGGACTGGATGCTGTGCG (R) CGGCGAAATCCAAAAGCAACAAG	545
3	(D) GGTGGCCGCAAGTGTAAAACA (R) TGAAGTTGTTCCCCAGCTCTGTGAC	582	9	(D) CCCTGGAGATCAAACCTGGCATCAG (R) GTGTTTGGCACGCTTCCGATTG	517
4	(D) GAGTTTATTCGAGTGTGGGCGGAGT (R) TGGGTTAGTGGGAGAATGGGCTCTA	524	10	(D) CAGCCTCGAAAAAATGAGAGAGCC (R) GCAATGAGCAGGCATACATATGGCA	524
5	(D) TGATTTTGTGATTGTGGTCGGCAG (R) TCGAAGTTGTCCATGATCACAGCG	540	CaV1.3a	(D) CGTGCAGCACTATGGTCAGTCTG (R) TATTCTGCCCTTGGCCTCTGG	785
6	(D) GGCAGCTCGGCTGATTAACCTCCT (R) CCCAGAATGGATGAGTCACGTGTCA	525	CaV1.1b	(D) ACTGGTGTCCATGAACATGCC (R) CAGCCGCCTGTCATTAACATTT	791

SH =Secuencia Homóloga encontrada. (D) =partidor directo. (R) =partidor reverso. pb =pares de bases del amplicón producido
Los partidores se presentan con orientación 3'-5'

Expresión de secuencias homólogas a CaV α 1 en pez-cebra juvenil.

Se analizó la expresión de supuestas CaV α 1 en pez-cebra mediante RT-PCR (Figura 11). Para probar la efectividad de los partidores generados para la detección, se utilizó como templado mRNA proveniente de individuos juveniles (2 meses), en donde la mayoría de las distintos tipos de la subunidad CaV α 1 se encuentran expresadas. El resultado de esta prueba se observa en la figura 10A.

Se logró detectar la expresión de 10 secuencias homólogas a la secuencia consenso de CaV α 1 (carriles 1-10), además de la expresión del mRNA codificante para CaV 1.3a (carril 11) y de CaV1.1b, característico del músculo esquelético (carril 12). Lo siguiente fue usar la misma batería de partidores para analizar la expresión de estas secuencias durante el desarrollo embrionario del pez-cebra.

Expresión de secuencias homólogas a CaV α 1 en embriones de pez-cebra.

Se obtuvo mRNA de embriones tardíos de 35 hpf, 25 hpf y de embriones tempranos en 75% de epibolía (8 hpf aprox.), y se realizaron los RT-PCR para cada templado. En embriones de 35 hpf (Figura 10B) se observó la expresión de 9 secuencias homólogas (carriles 2 – 10) y la expresión de ambas isoformas conocidas (carril 11 y 12). Sólo la secuencia 1 no pudo ser detectada consistentemente en este estadio embrionario (carril 1). En embriones de 25 hpf (Figura 10C) se logró detectar la presencia de mRNA correspondiente a las secuencias 3, 4, 5, 7, 8, 9 y 10 (carril 3 – 5 y 8 – 10), y a la isoforma del músculo esquelético (carril 11). Sin embargo, no se observó la banda esperada para las secuencias 1, 2 y 6 (carril 1, 2, 6), ni la banda correspondiente a la isoforma 1.3a (carril 12). En embriones tempranos (75% de epibolía) se observaron bandas intensas que indican la presencia de los mRNA provenientes de la secuencias homólogas 2, 7 y 8 (Figura 10D; carril 2, 7, 8). Pese a

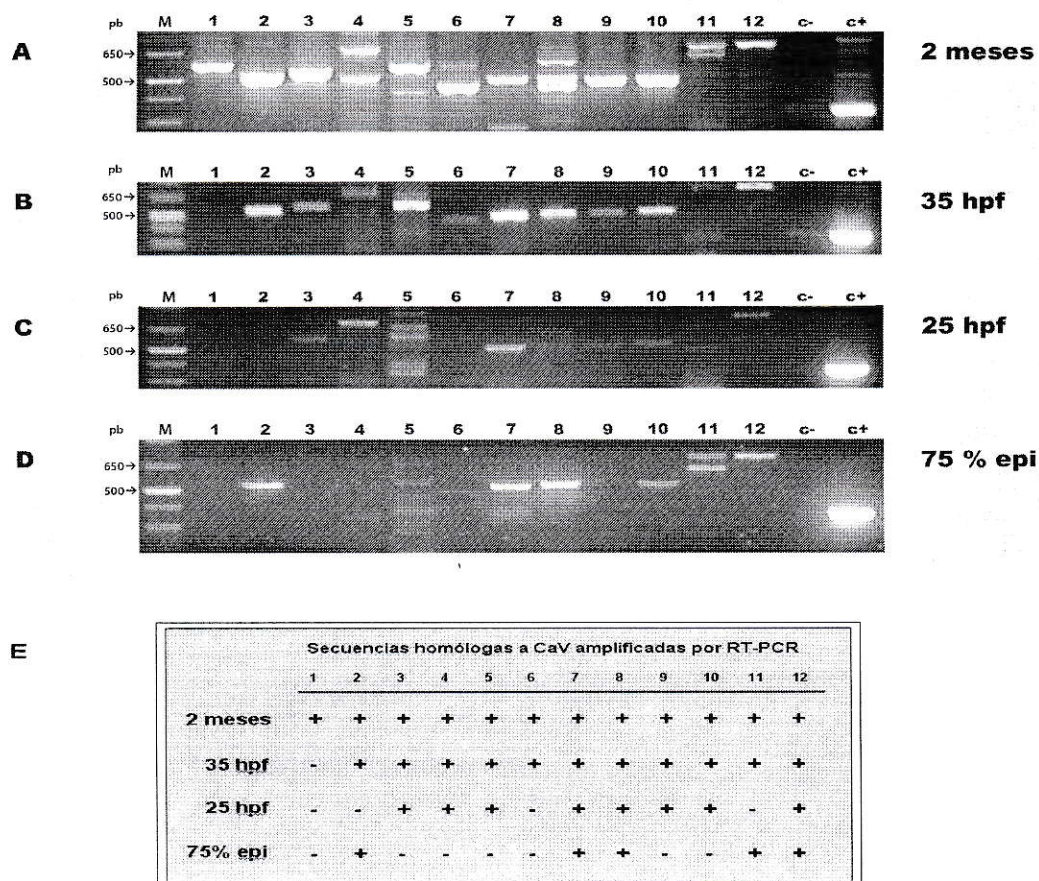


Figura 10. Expresión de secuencias nucleotídicas homólogas a la subunidad $\alpha 1$ de CaV en pez-cebra. Detección mediante RT-PCR usando mRNA extraído de individuos juveniles **(A)**, y de distintos estadios del desarrollo embrionario: 35 hpf. **(B)**, 25 hpf **(C)**, 75% epibolia **(D)**. **(Carriles 1-10)** La figura corresponde a la amplificación de las secuencias homólogas a subunidad $\alpha 1$ de CaV encontradas mediante BLAST. La banda más cercana a los 500 pb. corresponde al amplicón esperado para cada par de partidores. En los carriles 11 y 12 la banda ubicada en la parte superior del gel corresponde al tamaño de amplicón esperado. La amplificación generada en el **carril 11** es producto de partidores específicos para la subunidad $\alpha 1$ de CaV 1.3a, mientras que la del **carril 12** es producto de la combinación de un partidor pan- $\alpha 1$ de CaV (sentido), más uno específico para $\alpha 1$ de CaV de músculo esquelético (antisentido). **(E)** Cuadro resumen de la expresión de las secuencias homólogas a CaV en los distintos estadios analizados. El signo (+) indica expresión. El control positivo (**c+**) es β -actina de pez-cebra. El control negativo (**c-**) consta también de los partidores para β -actina pero carece de mRNA como templado, en su lugar se agrega agua a la reacción. **(M)** Marcador de peso molecular. **(pb)** pares de bases.

que en la foto del gel presentado en la figura 10D aparece la banda esperada que indicaría la expresión de la secuencia homóloga 10, este resultado no fue reproducido en la totalidad de oportunidades en que se repitió el experimento, a diferencia de la expresión de las secuencias 2, 7 y 8, que fue claramente consistente en todos los ensayos.

Estas observaciones mediante RT-PCR demuestran la expresión a nivel transcripcional de distintas secuencias homólogas a CaV α 1 en estadios embrionarios avanzados, como lo es el final de la segmentación (25 hpf aprox) y el comienzo de la motilidad en medio del periodo de faríngrula (35 hpf aprox). También se demuestra la expresión de tres de las 10 secuencias homólogas a CaV α 1 analizadas, y la expresión de las isoformas conocidas 1.3a y 1.1b en el desarrollo temprano de pez-cebra, específicamente en el estadio de 75% de epibolia, perteneciente al periodo de gastrulación.

Identificación de secuencias nucleotídicas homólogas a CaV α 1 expresadas en pez-cebra.

Para encontrar la identidad de las 10 secuencias homólogas a CaV α 1 que se lograron detectar en pez-cebra, se extrajeron las bandas correspondientes desde el gel electroforético, se purificaron y clonaron para su posterior secuenciación. Éstas fueron ingresadas como secuencia consulta en las bases de datos accesibles en NCBI y en Ensembl, para buscar su identidad mediante BLAST. Se realizó la búsqueda mediante algoritmos que permiten encontrar secuencias homólogas a nivel nucleotídico (BLASTN) y peptídico (BLASTX) en ambas base de datos. Además, con Ensembl se realizó la búsqueda contra la base de datos denominada “cDNA Ab initio” para llegar a las secuencias de donde se originaron los partidores para la detección mediante RT-

PCR. Los datos del proceso de identificación fueron analizados, comparando entre sí las secuencias obtenidas a través de los distintos algoritmos de búsqueda bioinformática.

Se logró ordenar en la tabla 3 los distintos códigos de acceso propios de cada base de datos que corresponden a una misma secuencia, tanto en su forma nucleotídica como peptídica. En la tabla 4 se muestra el tipo de CaV al que corresponde la secuencia detectada y en la figura 11 se muestra el cromosoma en donde ésta se encuentra.

Tabla 3. Códigos de acceso a las secuencias nucleotídicas homólogas a CaV α 1 encontradas.

SH	BLAST en NCBI		BLAST en Ensembl	
	Algoritmo utilizado		Algoritmo utilizado	
	MEGABLAST	BLASTX	BLASTN	BLASTX
1	XM_683360	XP_688452.2	ENSDART00000073924	ENSDARP00000068414
2	XM_001919512	XP_001919547	ENSDARESTT00000028301	ENSDARESTP00000028301
3	XM_685456	XP_690548	ENSDART00000043135	ENSDARP00000023232
4	NM_001114548	NP_001108020	ENSDART00000047719	ENSDARP00000047718
5	XM_001920515	XP_001920550	ENSDART00000085220	ENSDARP00000079666
6	XM_001921331	XP_001921366	ENSDART00000089971	ENSDARP00000084404
7	XM_001922886	XP_001922921	ENSDART00000065375	ENSDAR9P00000065374
8	XM_694190	XP_699282	ENSDART00000089317	ENSDARP00000083750
9	XM_686170.2	XP_691262	ZFISH7:21:1:46057314:1 ^(*)	
10	XM_692922	XP_698014	ENSDART00000008139	ENSDARP00000005825

SH = Secuencia Homóloga encontrada. (*) = Sin código de transcrito, se informa la ubicación del alineamiento. BLAST en NCBI y Ensembl son accesible a través de www.ncbi.nlm.nih.gov y www.ensembl.org, respectivamente

Tabla 4. Identificación y ubicación de las secuencias homólogas a CaV .

SH	BLASTN Ab-initio cDNAs (Genscan/SNAP) (*)	Tipo de CaV	Ubicación
1	GENSCAN00000011821	CaV 1.4	Cromosoma 8 (**)
2	GENSCAN00000026994	CaV 3.3	Andamio Zv7_NA743
3	GENSCAN00000038738	CaV 2.1a	Cromosoma 3
4	GENSCAN00000017802	CaV 2.2a	Cromosoma 5
5	GENSCAN00000015171	CaV 3.1	Cromosoma 12
6	GENSCAN00000041805	CaV 2.3	Cromosoma 8
7	GENSCAN00000031441	CaV 1.3b	Andamio Zv7_NA2946 (**)
8	GENSCAN00000017271	CaV 1.1a	Cromosoma 22
9	GENSCAN00000005484	CaV 2.2b	Cromosoma 21
10	GENSCAN00000013387	CaV 2.1b	Cromosoma 11

(*) = Códigos de las secuencias homólogas a al consenso de CaV α 1 encontradas inicialmente en el genoma de pez-cebra.

(**) = Ubicación cromosómica desconocida, se informa el código de acceso al andamio de ensamblaje en que se encuentra.

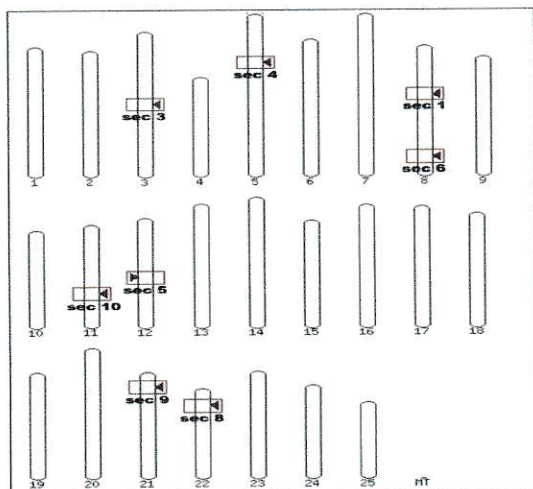


Figura 11. Ubicación en el cariotipo de pez-cebra de las secuencias homólogas a CaV α 1 encontradas.

Se destaca con un rectángulo de borde rojo el lugar del cromosoma en que se encuentra cada secuencia homóloga a CaV α 1 detectada por RT-PCR en embriones e individuos juveniles de pez-cebra.

Identificadas las secuencias detectadas en los experimentos de RT-PCR podemos dar cuenta de la expresión, al menos a nivel transcripcional, de los genes codificantes para CaV 1.1a, CaV 1.1b, CaV 1.3a, CaV 1.3b y CaV 3.3 durante la gastrulación (75% epibolía), etapa del desarrollo temprano de pez-cebra en donde aun no ocurre la diferenciación de células excitables.

Hibridación *In-Situ* de mRNA de CaV detectados por RT-PCR.

El paso siguiente fue intentar determinar el patrón de expresión espacial de los tres alfa-1 CaV encontrados por homología: CaV 1.1a (sec. 8), CaV 1.3b (sec. 7) y CaV 3.3 (sec. 2). Para ello se realizaron experimentos de hibridación *in-situ* en embriones completos de pez-cebra.

Se sintetizaron sondas sentido y antisentido de RNA a partir de los amplicones clonados, que anteriormente fueron generados en el RT-PCR, y se fijaron embriones de 48 hpf para probar la efectividad de las sondas. El mayor tamaño y el avanzado desarrollo de estructuras del sistema nervioso, locomotor y cardiovascular son razones para escoger este estadio embrionario, de modo de lograr una mejor observación de la especificidad de la marca que producen las sondas sintetizadas.

La figura 12 muestra marca aparentemente específica, ya que no se presenta homogéneamente en el embrión, sino más bien relativamente localizada en ciertas zonas, dejando otras sin tinción. La composición visual de una marca específica debería consistir en un puntillismo generado por la delimitación propia de la unidad celular en donde se expresa el mRNA a detectar, es decir, un conjunto de pequeños puntos de color morado donde cada uno representaría una célula en particular.

La figura 13 presenta la misma hibridación, pero en mayor magnificación, en donde se aprecia mejor la marca que producen las sondas testeadas. Sin embargo, no se aprecian diferencias entre la marca que produce la sonda antisentido y su control (sonda sentido), haciendo imposible determinar con certeza la presencia y lugar de expresión de los mRNA de CaV 1.1a, CaV 1.3b, y CaV 3.3 detectados por RT-PCR.

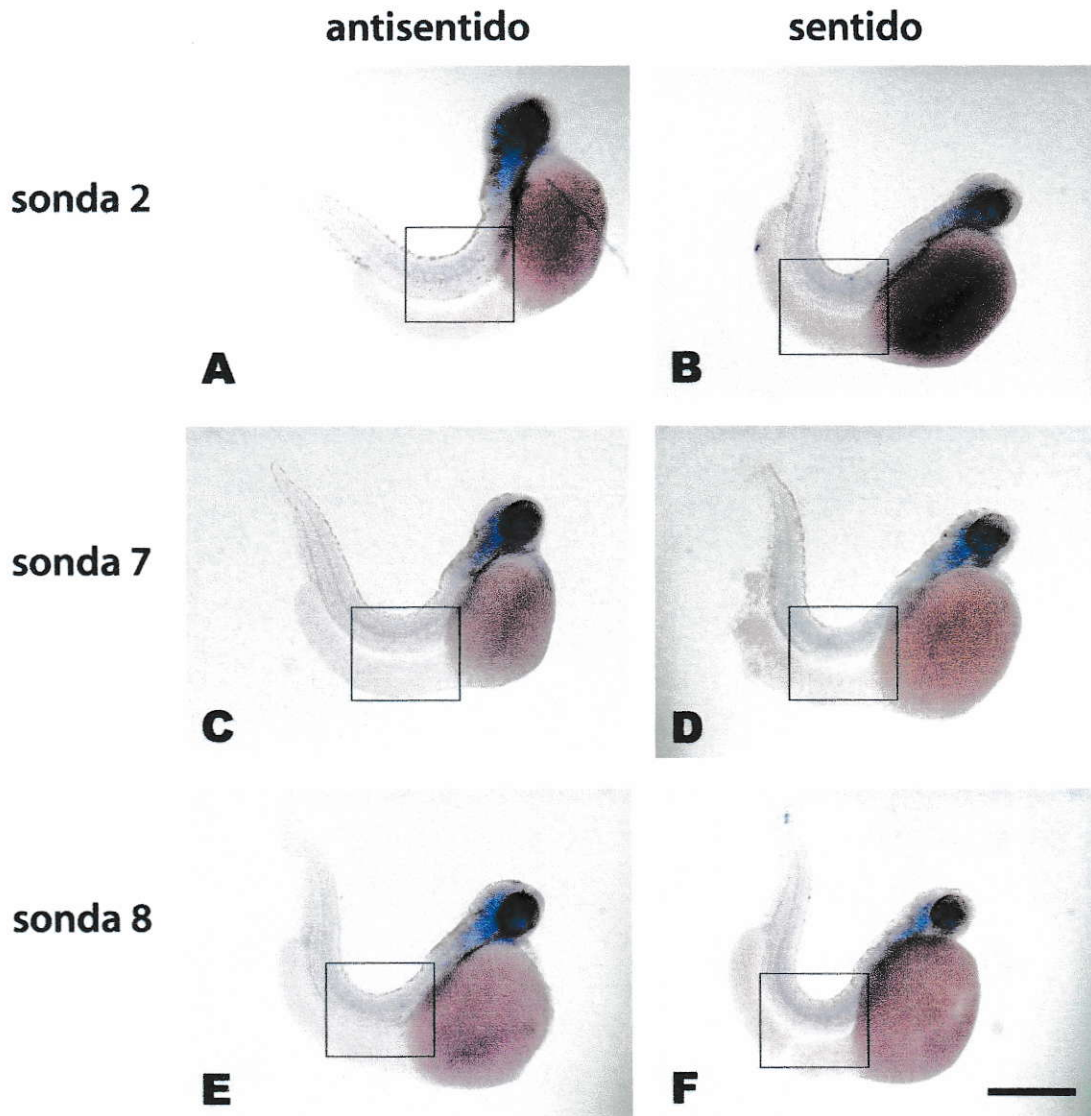


Figura 12. Hibridación *In-Situ* de embriones completos usando sondas contra mRNA de CaV α 1 putativos.

Se usaron las sondas antisentido para la detección de la secuencia 2 (A), secuencia 7(C) y secuencia 8 (E). Los cuadros (B), (D) y (F) muestran la sonda sentido respectiva para cada caso, usada como control negativo de la hibridación. La figura muestra la prueba de las sondas sintetizadas para la detección en embriones de 48 hpf. No se observan diferencias significativas en la tinción que genera la sonda antisentido al compararla con la sonda sentido (control) para ninguno de las tres pruebas. El área enmarcada por un borde blanco corresponde a la magnificación que muestra la Figura 13. La barra negra corresponde a 250 μ m y se aplica a todos los cuadros.

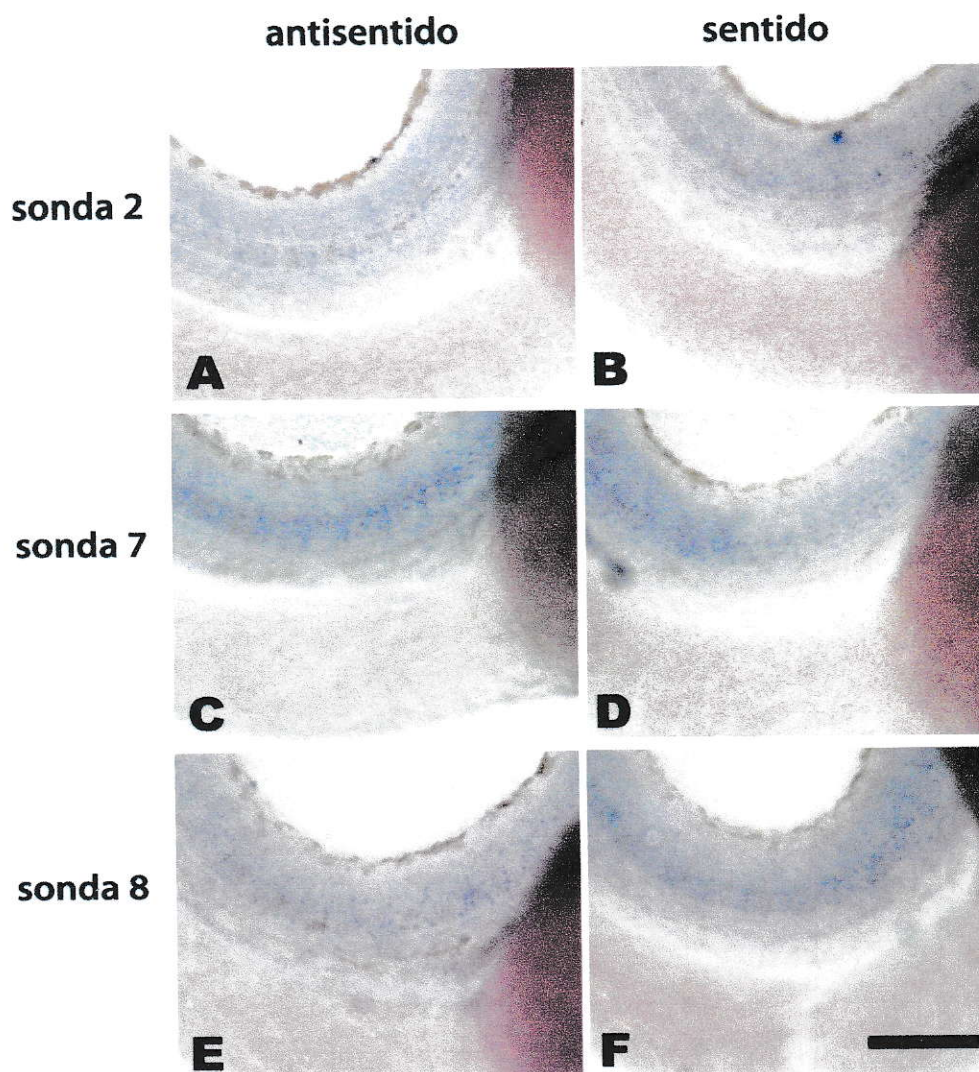


Figura 13. Hibridación *In-Situ* de embriones completos usando sondas contra mRNA de CaV α 1 putativos (Mayor magnificación).

Se presentan los aumentos de las imágenes expuestas en la figura anterior, con el mismo orden de las sondas antisentido y sentido correspondientes. La mayor magnificación de la zona permite observar marca aparentemente específica. Sin embargo, no se logra apreciar diferencias significativas entre la tinción en embriones experimentales (sonda antisentido) y los embriones control (sonda sentido). La barra negra corresponde a 100 μ m.

En los reiterados intentos de lograr una buena hibridación siempre se utilizó, como control de la técnica, la sonda capaz de detectar la expresión del mRNA de *cntn2*, cuyo producto peptídico es la contactina 2, denominado anteriormente como glicoproteína axonal de expresión transitoria o tag1, y que se expresa en neuronas, cerebro medio y posterior, sistema cardiovascular, y médula espinal entre otros. Se observa en la figura 14A, la expresión de *cntn2* en embrión completo de aproximadamente 35 hpf (estadio Prem-25, periodo de faringula), y con una mayor magnificación en la figura 14B.

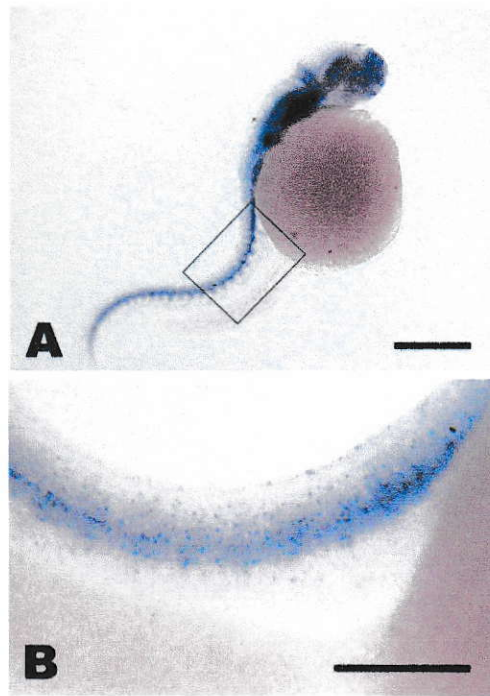


Figura 14. Patrón de expresión de *cntn2* en embrión de pez-cebra.

Se observa la marca producto de la sonda antisentido para *cntn2* en menor (A) y mayor (B) magnificación. Se observa un patrón de expresión punteado y en los lugares antes descritos en la literatura, lo que indica una correcta y específica marca. Esta hibridación *in-situ* se realiza a modo de control positivo de la técnica durante la prueba de sondas sintetizadas para la detección de las secuencias homólogas a subunidad $\alpha 1$ de CaV, y se lleva a cabo conjuntamente, en el mismo experimento. El área enmarcada por un borde blanco en (A), corresponde a la magnificación que se muestra en (B). La barra negra corresponde a 250 μm en (A) y 100 μm en (B).

Expresión de la proteína alfa-1 CaV.

Para realizar la detección de la subunidad alfa-1 CaV mediante inmunofluorescencia se escogió el anticuerpo Anti-pan CaV subunidad alfa-1, generado en conejo contra un epítopo intracelular conservado de rata, ubicado cerca del carboxilo terminal de los CaV. La secuencia reconocida por el anticuerpo presenta una alta similitud con las familias CaV1 y CaV2, además de una reactividad confirmada en rata y ratón informada por su fabricante (Alomone Labs).

Para asegurar que este anticuerpo puede también detectar los CaV de pez-cebra, se comparó la secuencia del péptido antígeno contra el cual fue creado, con las secuencias aminoacídicas de los CaV de pez-cebra recopiladas anteriormente (Tabla 1). También se realizó la comparación con los CaV de ratón. La figura 15 muestra el alineamiento del péptido antígeno con las secuencias peptídicas de los CaV de ratón (A) y pez cebra (B).

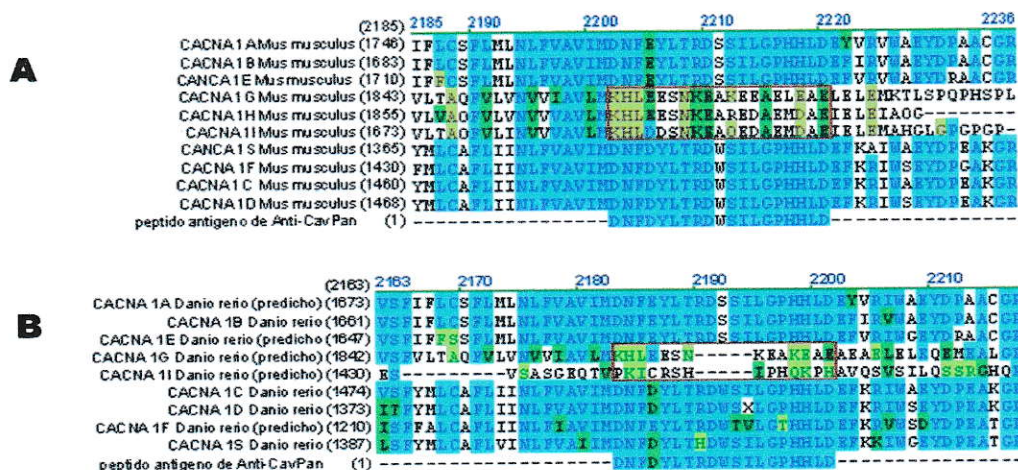


Figura 15. Análisis de la conservación del epítopo detectado por Anti-pan CaV.

Se observa el alineamiento entre el péptido antígeno del anticuerpo Anti-pan CaV α 1 con las secuencias peptídicas de CaV α 1 de ratón (A) y pez cebra (B). Los bloques azules indican posiciones idénticas. Los bloques verde oscuro representan alta similitud, mientras que los verde claro representan baja similitud. Se observa la conservación del epítopo en las familias CaV1 y CaV2 de ratón y pez-cebra. Sin embargo, con la familia CaV3, la similitud es muy baja (enmarcados en rojo).

El alineamiento contra los CaV de ratón (Figura 15A) muestra, en efecto, la alta similitud con la familia de los CaV 1 (alfa-1C, alfa-1D, alfa-1F y alfa-1S), donde 17 de los 19 residuos son idénticos, mientras que con la familia de los CaV 2 (alfa-1A, alfa-1B y alfa-1E) 18 de los 19 residuos son idénticos. Sin embargo, no existe similitud con la familia de los CaV 3 (alfa-1G, alfa-1H y alfa-1I). Al comparar el péptido antígeno con los CaV de pez-cebra (Figura 15B) se observa que en la familia de los CaV1, 17 de los 19 residuos son idénticos, y uno tiene alta similitud. Los miembros de la familia CaV2 tienen entre 16 a 18 residuos idénticos al péptido antígeno, mientras que al compararlo con la familia de los CaV3 la similitud es casi nula.

Este análisis confirma la conservación de esta secuencia, en las familias CaV1 y CaV2 entre mamíferos y peces, y la potencialidad del anticuerpo Anti-pan CaV α 1 para detectarlas. También da cuenta de la escasa probabilidad de detectar a miembros de la familia CaV3. Una vez conocidas estas características del anticuerpo, se lleva a cabo la detección por inmunofluorescencia de la subunidad CaV α 1 en células embrionarias de pez cebra.

Se realizó un cultivo de células provenientes del estadio de 50% de epibolia, se dejaron crecer hasta un estadio equivalente al término de la epibolia, se fijaron y se permeabilizaron para la detección. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal y luego deconvolucionadas para una mejor observación. La inmunofluorescencia usando el anticuerpo Anti-pan CaV α 1 muestra una intensa marca fluorescente verde en células embrionarias disgregadas, lo que indica la presencia de la proteína CaV α 1 (Figura 16A).

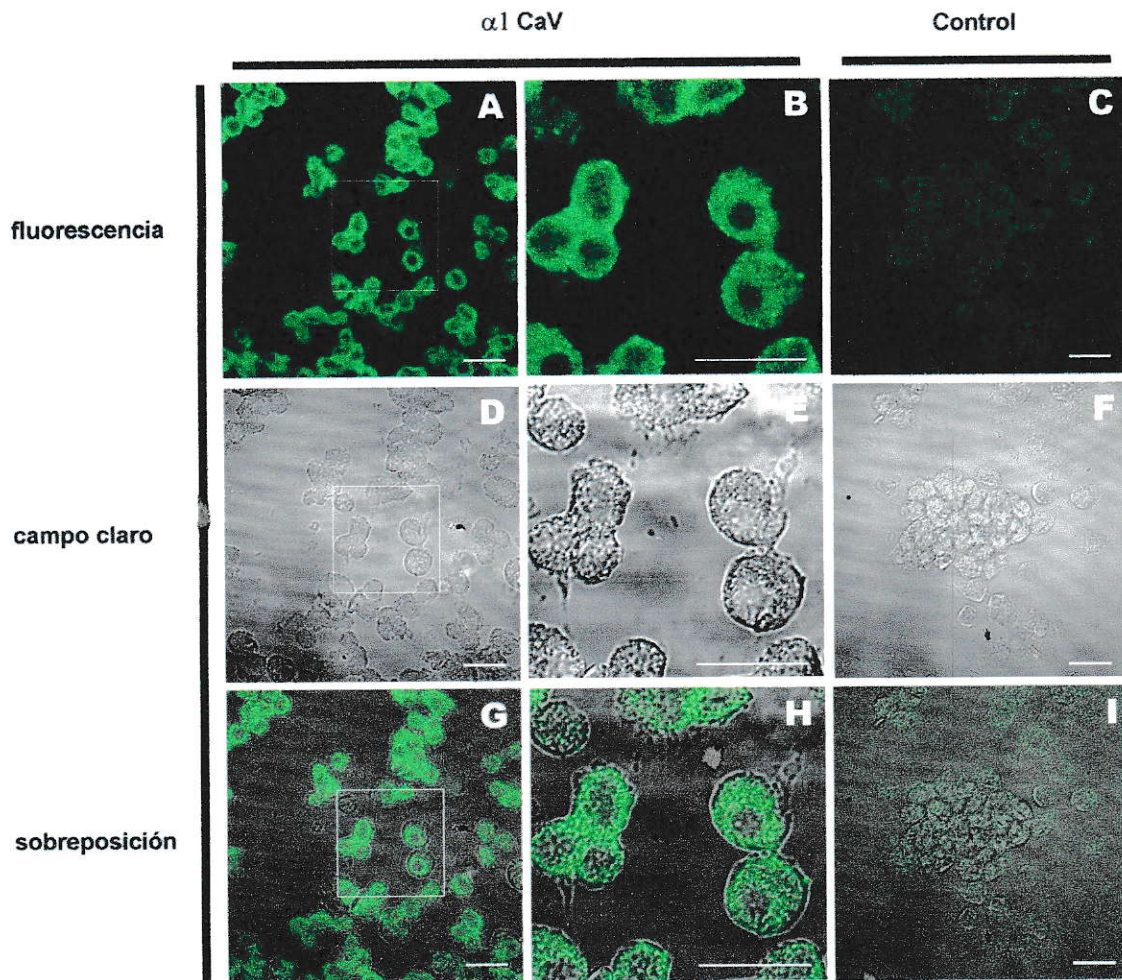


Figura 16. Expresión de la proteína CaV α 1 en células embrionarias en cultivo.

Se observa la detección mediante inmunofluorescencia de CaV α 1 usando el anticuerpo Anti-pan CaV α 1 en células embrionarias en cultivo mediante microscopía confocal. Se presentan las imágenes de fluorescencia (A, B, C), campo claro (D, E, F), y la sobreposición de ambas (G, H, I). Las imágenes (B), (E) y (H), corresponde al área enmarcada en borde blanco presente en (A), (D) y (G), respectivamente. (A) Se aprecia una intensa marca fluorescente verde indicando la presencia de la CaV α 1. (B) A mayor magnificación es evidente la distribución celular de CaV α 1, observándose células donde se concentra en la periferia, y otras donde se distribuye homogéneamente en el citoplasma. (C) Sin el anticuerpo primario se observa escasa fluorescencia. La barra blanca corresponde a 20 μ m en todos los cuadros. El experimento fue realizado en 6 oportunidades.

Al observar con mayor magnificación (Figura 16B), se pueden notar células cuya marca fluorescente se concentra principalmente en la periferia, mientras que en otras la marca se presenta distribuída homogéneamente en el espacio citoplasmático.

Sin agregar el anticuerpo primario la marca es casi nula, observándose solo una tenue fluorescencia posiblemente producto de una autofluorescencia de las células o de rastros del anticuerpo secundario que permanezcan posterior al lavado de éste (Figura 16C).

Para confirmar la especificidad de la detección, se realizó el ensayo preabsorbiendo el anticuerpo primario con su péptido antígeno, antes de agregarlo a las células fijadas. La marca producida por el anticuerpo preabsorbido es muy leve (Figura 17A) y similar a la observada en el ensayo sin anticuerpo primario (Figura 17C). En tanto el control del ensayo de preabsorción, en que se incubó el anticuerpo Anti CaV α 1 con agua en lugar del péptido antígeno, presenta intensa marca fluorescente verde (Figura 17B y C) al igual que la marca generada por el anticuerpo aplicado directamente (sin preabsorción, Figura 16A), lo que confirma la especificidad de la detección de la subunidad CaV α 1.

Estos resultados demuestran la expresión de la proteína CaV α 1 en el desarrollo temprano del pez-cebra. Sin embargo, por las características de detección del anticuerpo Anti-pan CaV α 1, no podemos dar cuenta de cual, o cuales, de los mRNA de CaV α 1 es el que produce la proteína detectada.

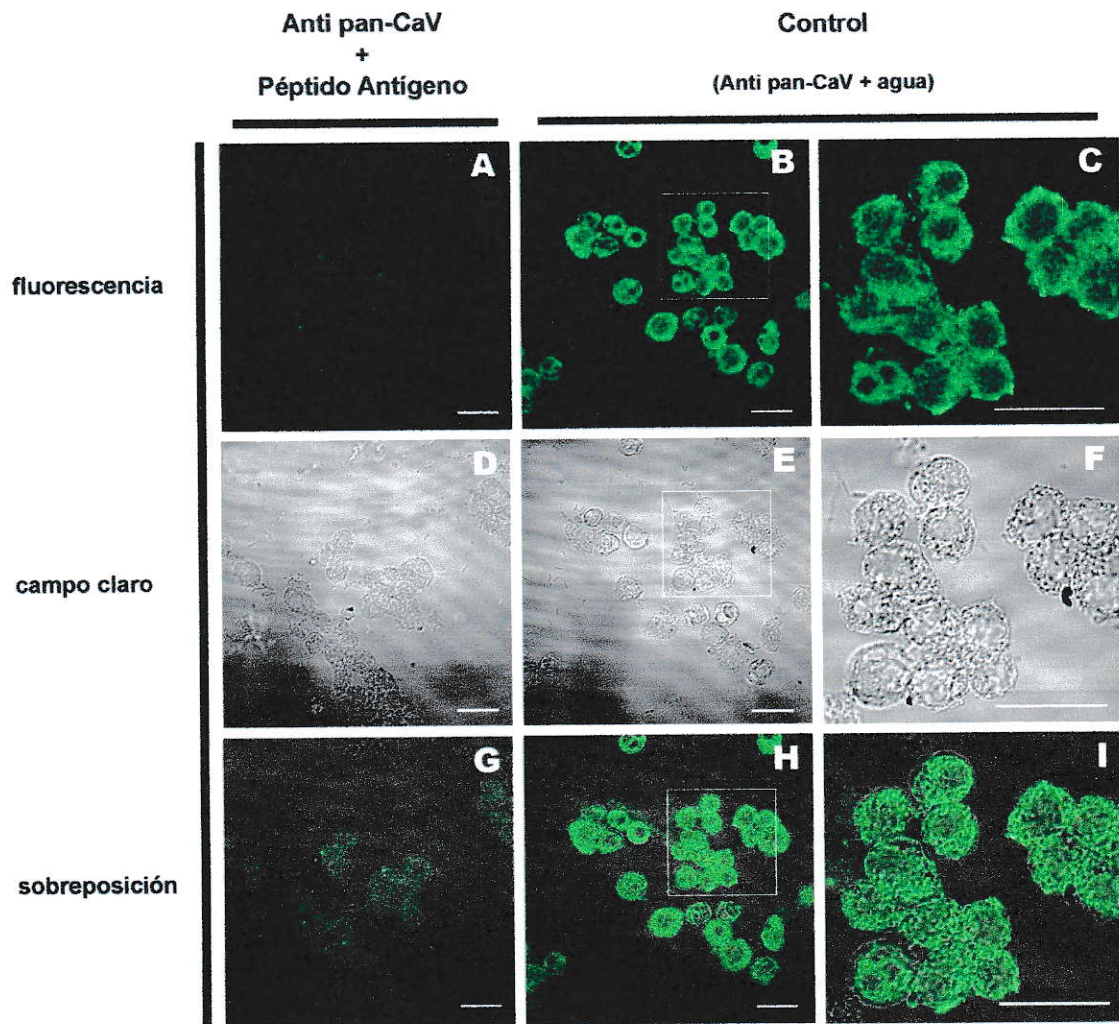


Figura 17. Ensayo de preabsorción del anticuerpo Anti-pan CaV α 1 en células embrionarias en cultivo.

La figura muestra la especificidad de la detección de CaV α 1. Se presentan las imágenes de fluorescencia (A, B, C), campo claro (D, E, F), y la sobreposición de ambas (G, H, I) usando Anti-pan CaV α 1 preabsorbido previamente con su péptido antígeno (A) y con agua (B). Los cuadros (C), (F) e (I), corresponde al área enmarcada por un borde blanco presentes en (B), (E) y (H) respectivamente. No se observa una fluorescencia significativa al agregar el anticuerpo previamente absorbido (A). Sin embargo, el anticuerpo sin preabsorber muestra una intensa marca (B), similar a la detectada por el anticuerpo agregado directamente (figura 16A). La barra blanca corresponde a 20 μ m en todos los cuadros.

DISCUSIÓN

Se ha demostrado que la presencia activa de transportadores de Ca^{+2} , como los CaV, son determinantes en la organogénesis de elementos del sistema cardiovascular y nervioso, y que también participan en la determinación del patrón dorso-ventral durante el periodo de gastrulación en anfibios (Palma y cols, 2001). Sin embargo, poco se sabe sobre la presencia de los CaV en las etapas tempranas del desarrollo de pez-cebra, modelo animal que presenta ventajas comparativas para el estudio del desarrollo embrionario respecto de otros vertebrados, debido a su desarrollo externo, gran cantidad de crías por cruce, y su transparencia durante las etapas tempranas de su desarrollo. En el presente trabajo estudiamos la expresión de los CaV en etapa avanzada y temprana del desarrollo embrionario de pez-cebra. Para ello se realizó una búsqueda bioinformática de los CaV en el genoma de pez-cebra mediante el consenso aminoacídico obtenido de secuencias de CaV de ratón y pez-cebra presentes en la base de datos de NCBI, y se diseñaron y usaron herramientas moleculares para observar su expresión, tanto a nivel de mRNA como de proteína.

Secuencias homólogas a CaV en el genoma de pez cebra.

Para encontrar secuencias homólogas a los CaV se utilizó como secuencia de consulta en BLAST el consenso aminoacídico (Figura 7) obtenido de la comparación de secuencias peptídicas conocidas y predichas computacionalmente de CaVs en ratón y pez-cebra (Tabla 1). Para tener acceso a todos los posibles CaV existentes en el genoma, se escogió la base de datos llamada "cDNA_*Ab initio*" disponible en

Ensembl, debido a que permite el acceso a transcritos identificados por algoritmos de predicción como Genscan y SNAP, y sobre los cuales no se posee evidencia experimental previa respecto de su expresión. De esta búsqueda se obtuvo una lista de secuencias de transcritos predichos (Figura 9), desde los cuales se generaron partidores para su posterior detección en estadios embrionarios de pez-cebra (Tabla 2). Las secuencias escogidas fueron las de mayor puntaje y tamaño de alineamiento, y en que los transcritos predichos tuviesen un tamaño similar a los CaV conocidos (cercano a 6 Kb).

La forma en que se determina las secuencias homólogas con mayor tamaño de alineamiento tiene que ver con la cantidad de veces que se repite un nombre en la lista generada por BLAST. Esto se debe a distintos alineamientos que una misma secuencia predicha genera con el consenso aminoacídico de CaV ingresado como consulta, y que al observar la ubicación de dicho alineamiento se puede notar que son aditivos, es decir, que al ensamblarlos, juntos abarcan una gran porción de la secuencia consenso.

Los partidores se generaron en el tercio de la secuencia más cercano la zona codificante para el carboxilo terminal (extremo 5'), puesto que en el proceso de retro-transcripción es más probable generar cDNAs que representen aquella zona. El tamaño escogido para el amplicón a detectar fue de entre los 500 y 550 pb, de modo de asegurar una rápida y fiel amplificación durante el PCR, y tener un tamaño adecuado para posteriormente generar sondas de RNA para hibridación *in-situ*.

Expresión e identidad de las secuencias homólogas a CaV en pez cebra

Debido a que en individuos juveniles (2 meses) se encuentra toda la variedad de células excitables, con las cuales se relaciona la expresión de los CaVs, se escogió su mRNA para probar la efectividad de los partidores diseñados. Se logró detectar la expresión de 10 secuencias homólogas al consenso de CaV (Figura 10A) que fueron identificadas como: CaV1.1a, CaV1.3b, CaV1.4, CaV2.1a, CaV2.1b, CaV2.2a, CaV2.2b, CaV2.3, CaV3.1 y CaV3.3 (Tabla 4). Además se logró detectar la expresión de CaV1.3a (Figura 10A, carril 11) y de CaV1.1b (Figura 10A, carril 12) con partidores anteriormente probados en nuestro laboratorio. Este CaV1.1b que se ubica en el cromosoma 8 ha sido denominado como isoforma "b" para diferenciarlo del detectado por los partidores creados en este estudio, que se ubica en el cromosoma 22, y que llamamos CaV1.1a. Lo mismo ocurre con CaV2.1a y CaV2.1b ubicados en el cromosoma 3 y 11 respectivamente, y con CaV2.2a y CaV2.2b ubicados en el cromosoma 5 y 21 respectivamente.

Cabe señalar que de las 10 secuencias detectadas, sólo CaV2.2a no es identificado como secuencia predicha en la base de datos de NCBI, lo cual indica que este trabajo muestra la primera evidencia experimental de la expresión de las otras 9 secuencias similares a CaV en pez-cebra.

La presencia de dos copias de los CaV detectados es consistente con las múltiples evidencias de la duplicación génica a gran escala sufrida por los teleósteos, como lo refleja el caso de los genes codificantes para CaV1.3a y b (LoGuidice y cols, 2006) y los que codifican los canales de sodio activados por voltaje (Novak y cols, 2006).

Expresión de CaVs durante el desarrollo de pez cebra.

Una vez identificadas las secuencias homólogas al consenso de CaV, se procedió a estudiar su expresión en estadios del desarrollo embrionario de pez-cebra. En embriones de 35 hpf.(Figura 3) correspondiente al estadio Prim 25, en donde comienza la motilidad en medio del periodo de faríngrula, se observa de manera consistente la presencia de los mismos mRNA de CaV identificados anteriormente en individuos juveniles (2 meses), excepto CaV1.4 (Figura 10B). La banda correspondiente al amplicón que indicaría la presencia del mRNA de CaV1.4 en este estadio se observó en dos de las tres veces en que se repitió el PCR (datos no mostrados), razón por la cual no se podría afirmar con completa seguridad su expresión. Sin embargo, esto puede haberse debido a fallas en el procedimiento del PCR en que esta banda no se encontró presente (Figura 10B). En mamíferos CaV1.4 es expresado en la retina (Doering y cols, 2005), estructura ya desarrollada en pez-cebra a las 35 hpf.

En embriones de 25 hpf. (Figura 3) correspondiente al estadio Prim-5, inicio del periodo de faríngrula, momento en el cual comienza la circulación de células sanguíneas, se observó la expresión de CaV1.1a y b, CaV2.1a y b, CaV2.2a y b, CaV1.3b y CaV3.1 (Figura 10C)

El resultado es consistente con los datos encontrados en la literatura, en donde se asocia la expresión de estos CaVs con estructuras anatómicas como el sistema cardiovascular, nervioso y locomotor, puesto que éstas se encuentran en avanzado desarrollo en este estadio embrionario del pez-cebra.

En mamíferos se conoce que CaV1.1 se expresa fuertemente en tejido muscular esquelético (Lacinova, 2005), mientras que en corazón su expresión es débil (Xu y cols, 2003).

CaV1.3a y b se expresan en neuronas bipolares de la retina del pez llamado carpín dorado (*Carassius auratus*), (LoGiudice y cols, 2007). Mientras que en salamandra, CaV1.3a se expresa en neuronas bipolares y conos fotoreceptores de la retina (Cristofanilli y cols, 2007). La aparición de la capa neuro-retinal comienza a aparecer justamente a las 24 hpf (estadio Prim-5), por lo que podríamos suponer que CaV1.3b se expresa antes que CaV1.3a en la retina en desarrollo del pez-cebra. Obviamente es necesaria mayor evidencia para afirmar esto.

Los canales de la familia CaV2 se expresan exclusivamente en neuronas. En mamíferos CaV2.1 es expresado tanto en cerebro como en el sistema nervioso periférico, mientras que CaV2.2 se expresa exclusivamente en cerebro (Lacinova, 2005). En humanos, CaV2.1 alcanza su máxima expresión en hipocampo y células de Purkinje (Gazulla y Tintore, 2007).

CaV3.1 ha sido detectado en cerebro anterior y cerebelo, aumentando su expresión durante el desarrollo perinatal de ratón (Yunker y cols, 2006). Se conoce de su expresión en cerebros de humano y rata, y a menores niveles en el corazón (Lacinova, 2005). También se expresa en células neuroendocrinas de rata GH3 (Mudado y cols, 2004). En cuanto a la presencia de CaV3.1 durante etapas tempranas del desarrollo embrionario, se ha observado su expresión en cóclea de pollo durante el estadio 8 (Levic y cols, 2007) y en cuerpos embrionarios formados por precursores cardiacos derivados de la línea celular troncal Ht7, desde el 5º día de cultivo (Mizuta y cols, 2005).

La presencia de CaV1.4, CaV2.3 o CaV3.3 no se logró detectar en embriones de 25 hpf equivalente al estadio Prim-5 del desarrollo de pez-cebra.

CaV2.3 se expresa en cuerpos celulares, dendritas y terminales nerviosos, (Catterall, 2000), y en células pancreáticas beta (Yang y Berggreen, 2007). Mientras

que CaV3.3 es expresado fuertemente en el cerebro medio y bulbo olfativo durante el nacimiento, y en cerebro y médula espinal durante el estadio E14 del desarrollo de ratón (Yunker y cols, 2006). También se conoce su expresión en células neuroendocrinas de rata GH3 (Mudado y cols, 2004).

En la etapa temprana del desarrollo de pez cebra, representada en este estudio mediante embriones en estadio de 75% de epibolia, perteneciente al periodo de gastrulación, se observó una robusta expresión de CaV 1.1a y b, CaV1.3a y b, y CaV3.3 (Figura 10D), pese a que en esta etapa recién están formándose las capas germinales que darán origen a los diferentes tipos celulares, por lo tanto no existe ningún tipo de célula excitable con las cuales se ha relacionado previamente la presencia de los CaV. Sin embargo, este trabajo no es la primera evidencia de la expresión de CaVs en etapa temprana del desarrollo de pez cebra. Anteriormente en nuestro laboratorio se detectó, mediante RT-PCR, la expresión de CaV1.1 y CaV1.3a desde el estadio de 2 y 4 células respectivamente, lo que refleja la presencia de mRNA de origen materno, puesto que la expresión de los genes del cigoto se inicia sólo después de las 3 hpf. (Ebert y cols., 2008). La expresión de CaV1.1 y CaV1.3a continúa de manera generalizada en el embrión durante los periodos de blástula y gástrula, mientras que en etapas más tardías se limita a somitos y al sistema nervioso central en formación, respectivamente (Sanhueza y cols, 2009). También en nuestro laboratorio fue descrita la expresión de CaV1.1 en la zona dorsal marginal de la gástrula temprana del anfibio *Xenopus laevis* (Palma y cols, 2001).

Dos tipos de CaV quedaron fuera del análisis de este trabajo: CaV1.2 y CaV3.2. En vertebrados, CaV1.2 es principalmente expresado en corazón. En pez-cebra, además, se ha detectado su presencia durante los últimos estadios del periodo de segmentación en el mesodermo de placa lateral, tubo cardiaco primitivo y primordio

pancreático, mientras que a las 48 hpf se aprecia su expresión en el tracto digestivo y sistema nervioso central (Rottbauer y cols, 2001).

En embriones de ratón se ha identificado una dominante expresión de CaV3.2 en los ventrículos del corazón durante el día 9,5 y 18 postcoito, disminuyendo posteriormente en la adultez (Yasui y cols, 2005).

Las diferencias en el patrón de expresión de los CaV aquí observados (Figura 10), durante los distintos estadios (35 hpf, 25 hpf, 75% de epibolia), son consistentes con la idea de que los CaV son expresados diferencialmente durante la ontogenia de los vertebrados. Otros antecedentes que apoyan esta idea han sido publicados. Tal es el caso registrado en células cardíacas, donde se observa el cambio de expresión de CaV3.1 a CaV3.2 durante el paso de la etapa temprana a tardía de diferenciación (Mizuta y cols, 2005). Algo similar ocurre en la maduración de células ciliadas de pollo, en donde se detecta la expresión de CaV3.1 en E8, que aumenta en E12, para desaparecer posteriormente en E16. Mientras que, CaV1.3 aumenta su expresión desde E8 a E16, contrariamente con lo que sucede con CaV1.2, el cual la disminuye (Levic y cols, 2007).

Al observar el resultado del RT-PCR en un estadio particular de los aquí estudiados (Figura 10), podemos notar la diferencia en la intensidad de la bandas entre los distintos tipos de CaV detectados. Esto podría atribuirse a una diferencia en el nivel de expresión de los mRNA de estos CaV, sin embargo, un análisis cuantitativo apropiado es requerido para afirmar esto. Con los partidores creados en este trabajo, es factible realizar ensayos de RT-PCR semicuantitativos que arrojen resultados al respecto.

Un resumen de lo conocido hasta ahora respecto a la expresión de CaV durante el desarrollo embrionario de pez-cebra se presenta en la figura 18. El diagrama de tipo

carta Gantt distingue, mediante colores, el aporte de cada trabajo al conocimiento de los patrones de expresión de los distintos CaV. El aporte realizado por este trabajo se destaca en color verde claro y es parte de la publicación señalada con el color verde oscuro (Sanhueza y cols., 2009).

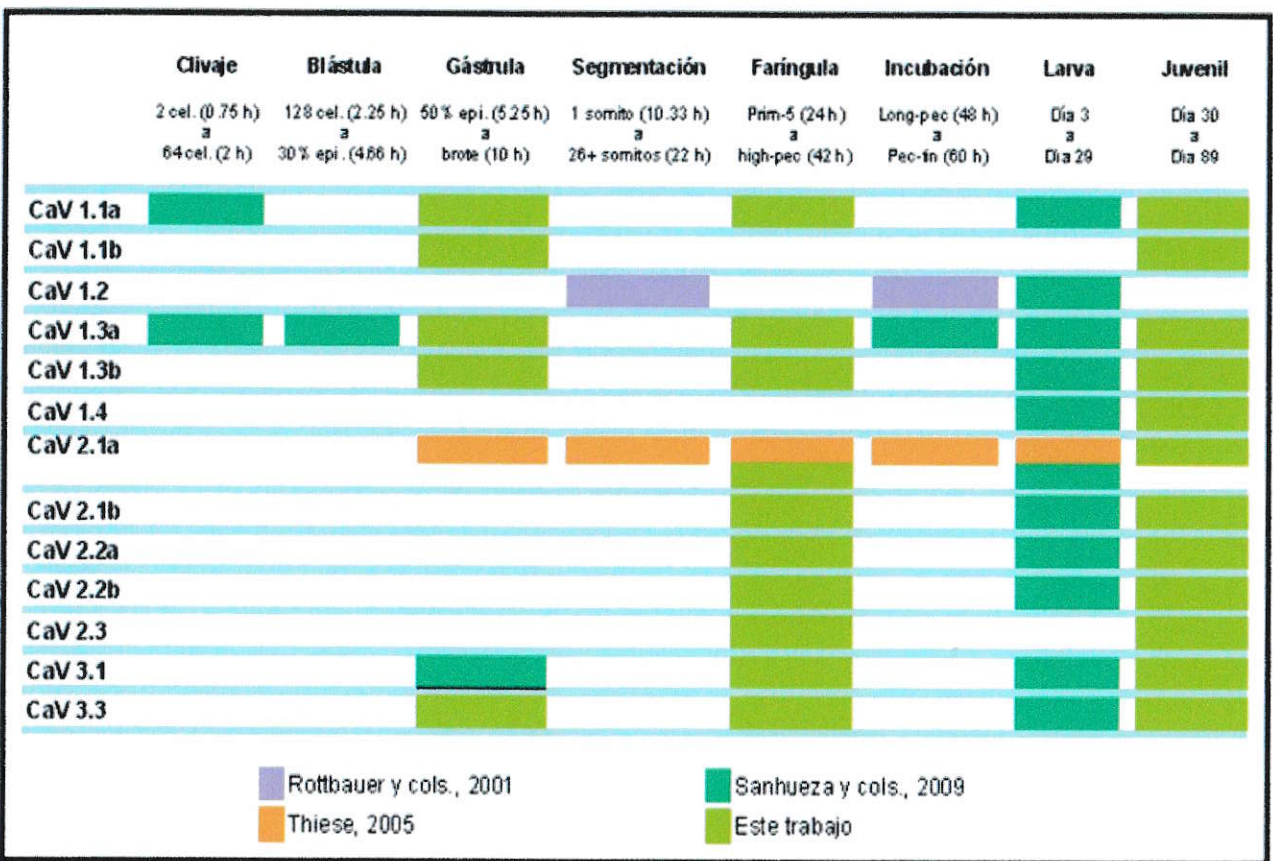


Figura 18. Carta Gantt de la expresión de los CaVs durante el desarrollo embrionario de pez-cebra.

El diagrama de Carta Gantt muestra en la columna de la izquierda la lista de los CaVs expresados en pez-cebra. En la fila superior se señalan los periodos del desarrollo embrionario indicando el estadio donde comienza y termina cada uno de ellos. La expresión de cada CaV es representada por rectángulos coloreados. Cada color corresponde a la publicación donde se informa la expresión del determinado CaV.

Observación de los mRNA de CaV mediante Hibridación *In-Situ*.

Puesto que el principal interés de este trabajo es demostrar la presencia de CaV en el desarrollo temprano de pez-cebra, se escogieron los amplicones de los CaV detectados en el estadio de 75% de epibolia (CaV1.1a, CaV1.3b y CaV3.3) para generar sondas de mRNA. Lamentablemente no se logró obtener una limpia y clara hibridación *in-situ*. Se modificaron tiempos y temperaturas de incubación, lavado y revelado de la sonda, en uno y otro protocolo, intentado modificar el grado de estrictez de la sonda. Se repitió en tres oportunidades la síntesis de las sondas sentido y antisentido pensando en la existencia de algún error en los pasos de transcripción, limpieza y almacenamiento de la sondas. Sin embargo, no se obtuvieron resultados claros en cuanto a la especificidad de la marca en embriones de 75% de epibolia. La marca generada por estas tres sondas en este estadio embrionario (datos no mostrados) es generalizada y de similar característica a la observada en trabajos previos en nuestro laboratorio con las sonda para CaV1.1 y CaV1.3a (Sanhuesa y cols, 2009). Pese a ello, nada se puede asegurar de la especificidad de la detección, pues las sondas sentido producen similar resultado. Por esta razón, se escogió un estadio más avanzado del desarrollo de pez cebra (48 hpf) que, gracias al mayor tamaño del embrión junto a la avanzada organogénesis, permitiese una mejor apreciación de la marca, esperando encontrar una más clara localización de la misma.

Al observar el resultado de la hibridación *in-situ* con las sondas antisentido en embriones de 48 hpf (Figura 12 y Figura 13), se aprecia una marca aparentemente específica, puesto que se encuentra localizada en zonas correspondientes al sistema nervioso, locomotor y cardiovascular, y se presenta con un patrón de puntos, donde cada uno de ellos es generado por la expresión de una célula en particular. Sin embargo, las sondas sentido producen similar resultado, haciendo imposible afirmar

que la marca observada con las sondas antisentido corresponda a los mRNA de los CaV estudiados.

Tampoco se realizó un análisis minucioso de los sitios no conservados entre estos mRNA, que permitiese la creación de sondas adecuadas, capaces de detectar específicamente cada uno de los distintos mRNA de CaV evidenciados mediante RT-PCR.

Sin duda, una confiable observación de la presencia del mRNA de CaVs mediante hibridación *in-situ*, hubiese arrojado importantes datos sobre el patrón temporal y espacial de éstos durante el desarrollo de pez-cebra.

Mediante esta técnica un estudio en pez-cebra de los transcritos codificantes para canales de sodio activados por voltaje (Novak y cols, 2006), demuestra la expresión de diversos mRNA con distintos patrones de expresión, que son temporal y espacialmente dinámicos durante estadios embrionarios y larvales. Los canales de sodio activados por voltaje poseen similitudes con los CaV en cuanto a estructura, ya que comparten entre otras características, como estar organizados en cuatro grandes dominios, cada uno con seis segmentos transmembrana. (Struyk y Cannon, 2007).

El trabajo de Novak y cols. (2006) demuestra la segregación espacial y temporal en la expresión de subtipos de un mismo canal de sodio activado por voltaje (Scn). Por ejemplo, *scn5Laa* es detectado a las 24 hpf en el tubo cardiaco, a las 48 hpf es detectado difusamente en la región dorsal del cerebro medio y posterior, mientras que a las 60 hpf se expresa en la región rostral del sistema nervioso. En cambio, la expresión de *scn5Lab* es detectada transitoriamente a las 19 hpf en somitos, la que desaparece a las 30 hpf, pero aparece en la médula espinal ventral, y luego, a las 60 hpf se detecta levemente en la línea lateral en desarrollo. Una expresión temporal y

especialmente dinámica podría estar sucediendo con la expresión de CaV1.1a y b, CaV2.1a y b, y CaV2.2a y b durante el desarrollo embrionario de pez-cebra.

Expresión de la proteína CaV α 1.

Con el fin de hacer dar más soporte a la demostración de la presencia de CaVs durante el desarrollo temprano de pez-cebra, se decidió realizar una detección de la proteína mediante inmunofluorescencia en células embrionarias en cultivo (Figura 16), con desarrollo equivalente al final de la gastrulación (Figura 3). Para ello se escogió un anticuerpo "panCaV", capaz de reconocer un epítipo conservado en las familias CaV1 y CaV2, pero no en la familia CaV3 (Figura 15). Gracias a la incorporación de los controles adecuados a la técnica, como la ausencia y preabsorción del anticuerpo primario (Figura 16C y Figura 17A, respectivamente), se logró detectar fehacientemente la presencia de la subunidad α 1 CaV (CaV α 1) en células embrionarias en cultivo (Figura 16A).

Se observa la presencia de CaV α 1 concentrada en la periferia de la mayoría de las células, lo que se puede comprobar al mirar la imagen que superpone la inmunofluorescencia con el campo claro (Figura 16H), en donde se distinguen perfectamente los límites de cada célula. Esto indicaría la presencia de CaV α 1 en la membrana celular. Sin embargo, para afirmar esta suposición, podría realizarse un ensayo de inmunofluorescencia incorporando mRNA de la proteína integral de membrana fusionada con RFP mediante microinyección en el estadio de dos o cuatro células, luego se analiza la colocación de la fluorescencia verde (anticuerpo secundario) con la roja (RFP-membrana).

En cuanto a la función que podrían estar desempeñando los CaV durante el desarrollo temprano, se sabe por estudios realizados en nuestro laboratorio en

embriones de *Xenopus laevis*, que CaV1.1 regula el patrón mesodermal especificando la identidad dorso-ventral de las células del mesodermo (Palma y cols, 2001). Sin embargo, efectuada la inactivación de CaV de pez-cebra mediante el uso de bloqueadores específicos en etapas tempranas de su desarrollo, no arrojan los mismos resultados obtenidos en anfibio (Sanhueza y cols, 2009). Tal vez los CaV estén participando en otras funciones distintas al transporte de calcio, como sucede con la subunidad auxiliar CaV β 4, de la cual se ha reportado su función como proteína andamio durante el desarrollo temprano de pez-cebra (Elbert y cols, 2008).

La evidencia experimental generada en este trabajo demuestra la existencia y expresión de variados genes codificantes para CaV en pez-cebra. Además, se demuestra la expresión de éstos en etapa temprana y tardía del desarrollo embrionario, tanto a nivel transcripcional como traduccional. Considerando la detección de CaVs en el periodo de gastrulación, podemos afirmar que variados CaV son expresados antes de la diferenciación de células excitables.

CONCLUSIONES

El uso de herramientas bioinformáticas permitió la identificación de diversos CaV en el genoma de pez-cebra, y el posterior diseño de herramientas moleculares para la detección de los mRNA correspondientes.

Se logró observar la expresión de los mRNA producto de los genes encontrados *in-silico*, en individuos juveniles de pez-cebra y, de paso, verificar la efectividad de los partidores creados para su detección mediante RT-PCR.

Se identificaron los patrones de expresión de éstos mRNA codificantes para CaV, mediante RT-PCR, en etapa tardía (Prim-5 y 15, pertenecientes al periodo de farínghula) y temprana (75% de epibolia, perteneciente al periodo de gástrula).

Se identificó la presencia de CaV a nivel proteico, mediante inmunofluorescencia, en células disgregadas con desarrollo equivalente al término del periodo de gástrula.

Las evidencias presentadas en este trabajo demuestran la presencia de canales de calcio activados por voltaje en una etapa del desarrollo previa a la diferenciación de células excitables.

BIBLIOGRAFÍA

Arikkath, J. y Campbell, K.P. (2003). Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Current Opinion in Neurobiology* ; 13:298-307.

Berridge, M.J., Lipp P. y Bootman M.D. (2000). The Versatility and Universality of Calcium Signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*; 1:11-21.

Birnbaumer, L., Qin, N., Olcese, R., Tareilus, E., Platano, D., Costantin, J., y Stefani, E. (1998). Structures and functions of calcium channel beta subunits. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*; 30:357-375.

Burgess, A. M. y Vere, D. W. (1989). Teratogenic effects of some calcium channel blocking agents in *Xenopus* embryos. *Pharmacology and Toxicology*; 64: 78-82.

Catterall, W.A. (2000). Structure and Regulation of Voltage-Gated Ca^{+2} Channels. *Annual Review of Cell Developmental Biology*; 16:521-555.

Créton, R., Speksnijder, J. y Jaffe, L. (1998). Patterns of free calcium in zebrafish embryos. *Journal of Cell Science*; 111: 1613-1622.

Cristofanilli M, Mizuno F, Akopian A. (2007). Disruption of actin cytoskeleton causes internalization of Ca(v)1.3 (alpha 1D) L-type calcium channels in salamander retinal neurons. *Mol Vis.* Aug 28;13:1496-507

Dolphin, A.C. (2003). α_1 Subunits of Voltage-Gated Calcium Channels. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*; 35: 599-620.

Ebert AM, McAnelly CA, Srinivasan A, Linker JL, Horne WA, Garrity DM. (2008). Ca²⁺ channel-independent requirement for MAGUK family CACNB4 genes in initiation of zebrafish epiboly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 8;105(1):198-203

Gazulla, J. Tintoré, M. (2007). Canales de calcio dependientes de voltaje de tipo P/Q en neurología. *Neurología* 2007;22(8):511-516

Gilbert, S.F. (2000) *Developmental Biology*, 6ª edición, Sunderland. Massachusetts, EE.UU. Sinauer Associates, Inc.

Hanlon, M.R. y Wallace, B.A. (2002). Structure and Function of Voltage-Dependent Ion Channel Regulatory α_1 Subunits. *Biochemistry*; 41:2885-2894.

Lacinová, L. (2005). Voltage-Dependent Calcium Channels. *Gen Physiol Biophys.* Jun;24 Suppl 1:1-78. Review.

Leclerc C., Néant I, Webb S. E., Miller A. L., Mureau M. (2006). Calcium transients and calcium signalling during early neurogenesis in the amphibian embryo *Xenopus laevis*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763, 1184–1191. Review.

Leclerc, C., Webb, S. E., Daguzan, C., Moreau, M., Miller, A. L. (2000) Imaging patterns of calcium transients during neural induction in *Xenopus laevis* embryos. *J. Cell Sci* 113, 3519–3529.

Levic S, Nie L, Tuteja D, Harvey M, Sokolowski BH, Yamoah EN. (2007) Development and regeneration of hair cells share common functional features. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Nov 27;104(48):19108-13

Lodish, Berk, Matsudaira, Keiser, Krieger, Scott, Zipursky y Darnell. (2004) *Molecular Cell Biology*. 5ª edición, Freeman and Company.

LoGiudice, L., Henry, D., Matheews, G. (2006). Identification of calcium channel α_1 subunit mRNA expressed in retinal bipolar neurons. *Mol Vis.* Mar 17;12:184-9.

Mizuta, E; Miake J M; Yano S; Furuichi H; Manabe K; Sasaki N; Hisatome I,. (2005). Subtype Switching of T-Type Ca²⁺ Channels From Cav3.2 to Cav3.1 During Differentiation of Embryonic Stem Cells to Cardiac Cell Lineage. *Circ J* ; 69: 1284–1289

Montell, C. (2005). The Latest Waves in Calcium Signaling. *Cell*; 122:157-163.

Moreau M., Néant, I., Webb, S. E., Miller A. L., Leclerc, C. (2008). Calcium signalling during neural induction in *Xenopus laevis* embryos. *Phil. Trans. R. Soc. B* 363, 1371–1375

Mudado MA, Rodrigues AL, Prado VF, Beirão PS, Cruz JS. (2004). *Braz J Med Biol Res.* Jun;37(6):929-35. Epub 2004 May 27CaV 3.1 and CaV 3.3 account for T-type Ca²⁺ current in GH3 cells.

Novak AE, Taylor AD, Pineda RH, Lasda EL, Wright MA, Ribera AB. (2006) Embryonic and larval expression of zebrafish voltage-gated sodium channel alpha-subunit genes. *Dev Dyn.* Jul;235(7):1962-73.

Palma, V., Kukuljan, M. y Mayor, R. (2001). Calcium mediates dorsoventral patterning of mesoderm in *Xenopus*. *Current Biology*; 11:1606-1610.

Reinhard, E., Yokoe, H., Niebling, K., Allbritton, N. L., Kuhn, M. y Meyer, T. (1995). Localized Calcium Signals in Early Zebrafish Development. *Developmental Biology*; 170: 50-61.

Rottbauer W, Baker K, Wo ZG, Mohideen MA, Cantiello HF, Fishman MC. (2001). Growth and Function of the Embryonic Heart Depend upon the Cardiac-Specific L-Type Calcium Channel α_1 Subunit. *Developmental Cell*, Vol. 1, 265–275

Sanhueza, D., Montoya A., Sierralta, J., Kukuljan, M. (2009). Expression voltage-activated calcium channels in the early zebrafish embryo. *Zygote*. 2009 May;17(2):131-5

Struyk, AF., **Cannon**, SC. (2007). A Na⁺ channel mutation linked to hypokalemic periodic paralysis exposes a proton-selective gating pore. *J Gen Physiol*. Jul;130(1):11-20

Webb, S.E and **Miller**, A.L. (2000). Calcium signaling during zebrafish embryonic development. *Bioessays*; 22:113-123.

Webb, S.E and **Miller**, A.L. (2003). Calcium signaling during embryonic development. *Nature Reviews*; 4:539-551.

Westfall, T.A., Hjertos, B. y Slusarski, D. (2003). Requirement for intracellular calcium modulation in zebrafish dorsal-ventral patterning. *Developmental Biology*; 259: 380-391.

Yang, Shao-Nian and **Berggren**, Per-Olof. (2007). The Role of Voltage-Gated Calcium Channels in Pancreatic-Cell Physiology and Pathophysiology. *Endocrine Reviews* 27(6):621–676

Yasui K, Niwa N, Takemura H, Opthof T, Muto T, Horiba M, Shimizu A, Lee JK, Honjo H, Kamiya K, Kodama I. (2005). Pathophysiological Significance of T-type Ca²⁺ Channels: Expression of T-type Ca²⁺ Channels in Fetal and Diseased Heart. *J Pharmacol Sci* 99, 205 – 210.

Yunker A, Sharp A, Sundarraj S, Ranganathan V, Copeland T, McEnery M. (2006) Immunological characterization of T-type voltage-dependent calcium channel CaV3.1 (alpha 1G) and CaV3.3 (alpha 1I) isoforms reveal differences in their localization, expression, and neural development. *Neuroscience*. 2006 Oct 13;142(2):607.

Xu M, Welling A, Papparisto S, Hofmann F, Klugbauer N. (2003) Enhanced expression of L-type Cav1.3 calcium channels in murine embryonic hearts from Cav1.2-deficient mice. J Biol Chem. Oct 17;278(42):40837-41.