



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EXPRESIÓN DE CANALES DE SODIO EN  
CÁNCER CERVICOUTERINO GENERADO POR VPH-18**

**T E S I S**

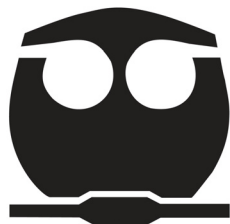
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A**

**ANA LAURA SÁNCHEZ SANDOVAL**

**Tutor: Dr. Juan Carlos Gómora Martínez**



**MÉXICO, D.F.**

**2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** DR. FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

**VOCAL:** DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO

**SECRETARIO:** DR. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ

**1er. SUPLENTE:** DRA. MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO

**2° SUPLENTE:** DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**DEPARTAMENTO DE NEUROLOGÍA MOLECULAR,  
DIVISIÓN DE NEUROCIENCIAS, INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM**

**ASESOR:**

---

DR. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ

**SUSTENTANTE:**

---

ANA LAURA SÁNCHEZ SANDOVAL

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que ya era parte de mí desde antes de nacer, y que me proporcionó (y sigue proporcionando) una preparación académica y personal de calidad y valor inigualables.

Al Dr. Juan Carlos Gómora, por brindarme la asesoría y las herramientas necesarias para llevar a cabo este trabajo, así como permitirme ser parte de la familia que conforma a nuestro laboratorio.

A Everardo Hernández, que no sólo ha sido un excelente coach sino también un gran amigo y consejero. ¿Qué organizas Ever?

A Clara Díaz, que también me ha brindado mucho apoyo en el laboratorio y a la cual le he tomado mucho aprecio.

A Kiyoshi, Osbaldo, Sarahí, Roger y Manolo, que forman parte de la familia BL-203 y con los cuales he compartido mucho y he pasado momentos increíbles.

Se reconoce la colaboración del Dr. Jaime Berumen Campos, del Hospital General de México, en cuyo laboratorio se realizó la extracción del RNA de las biopsias de cáncer cervicouterino y de cérvix no canceroso.

Se reconoce el apoyo brindado por la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, en donde se realizaron los experimentos de PCR en tiempo real y algunas secuenciaciones.

Se reconoce a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM, que nos apoyó con algunas secuenciaciones.

El proyecto fue apoyado por el PAPIIT (IN206008) de la DGAPA, UNAM, y por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (PICDS08-28), mismo que me proporcionó una beca de titulación durante un año.

## DEDICATORIAS

A mi mamá. Gracias a ti soy quien soy y estoy donde estoy. Sin ti nada de esto hubiera sido posible. Infinitas gracias por todo lo que me has brindado y por ser mi ejemplo a seguir. Te admiro y te adoro Mami bonita.

A mi papá. Gracias por el apoyo a tu manera. Gracias por enseñarme tantas cosas. Gracias por hacerme fuerte y mostrarme que hay más de una manera de ver la vida. . . Sigues siendo mi superhéroe. Estás loco y así te quiero!

A Paty. Eres más que una amiga. Mi consejera y confidente. Siempre sabes qué decir y darme el abrazo que necesito. Sabes lo mucho que te quiero. Vamos a calentar el sol!

A mis hermanos; Fer y Alex. Los tres somos tan diferentes y aún así siempre podremos disfrutar un buen concierto, o compartir un buen café. Afortunados los que tenemos manos y podemos lanzar arroz en año nuevo.

A mi familia, que a pesar de la distancia, siempre me acompaña.

A mi abuelo, que estoy segura me observa y cuida desde donde sea que esté.

A Viri y Piby. Amigas incomparables e inigualables. Brindadoras de apoyo, diversión, aventuras, locuras, consejos, compañía, alegrías, buenos viajes, reflexiones y mucho más. Por toda una vida juntas, niñas!

A Suj, Pau, Sam, Adriana, Carlos, Diana, Viri Lu y Karla. Amigos para toda la vida. Mi otra familia. Un gran tesoro que me ha dejado la facultad.

A Chavira y a Dany. No importa cuánto tiempo pase, siempre nos volveremos a ver como si acabáramos de salir de una clase de Calderón o de tocar "*mi con sol*". Siempre juntos, en las buenas y en las malas. SIEMPRE.

A Luis y Chenz. Grandes amigos. Vecinos de ambas casas. Caminos diferentes, cariño en común. Los quiero mucho.

A los Cecafricanos, que ya son como una segunda familia.

A ML. Eres mi presente y mi futuro. Mi mundo entero. No tengo palabras. TANH.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
Cáncer Cervicouterino .....	3
VPH y Desarrollo del CaCu .....	4
Vacunas Contra el CaCu .....	6
Canales Iónicos Dependientes de Voltaje .....	7
Canales de Sodio Dependientes de Voltaje .....	9
Canales Iónicos y Cáncer .....	11
Canales de Potasio .....	12
Canales de Calcio .....	13
Canales de Sodio .....	13
Cáncer Cervicouterino y Canales Iónicos .....	15
<b>ANTECEDENTES INMEDIATOS</b> .....	<b>16</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>18</b>
<b>OBJETIVO</b> .....	<b>18</b>
Objetivos Particulares .....	18
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>19</b>
Obtención de RNA de Muestras Biológicas .....	19
RT-PCR Estándar o de Punto Final .....	19
RT-PCR en Tiempo Real .....	23
Rangos Dinámicos .....	26
Reacción de RT-PCR en Tiempo Real .....	27
Determinación de la Abundancia Relativa del Mensajero de Cada Gen .....	29
Caracterización de las Isoformas de $Na_v1.5$ .....	30
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
Identificación de las Subunidades $Na_v1.6$ y $Na_v1.7$ por RT-PCR Estándar .....	32
Determinación de los Rangos Dinámicos para las Isoformas de $Na_v1.5$ .....	38
Análisis de la Expresión de los CSDV .....	40
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>47</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>52</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>53</b>

## RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es un problema de salud mundial, principalmente en países en vías de desarrollo, donde ocupa el segundo lugar en frecuencia entre mujeres y causa más de 270,000 muertes anualmente. Un avance importante en el tema ha sido la correlación de la presencia del Virus del Papiloma Humano (VPH) en más del 99% de los casos de CaCu. Existen más de 100 tipos de VPH, entre los cuales el VPH tipo 16 y el VPH tipo 18 son los responsables de alrededor del 70% de los casos de CaCu. A pesar del conocimiento generado sobre el tema, poco se sabe acerca de posibles marcadores moleculares que permitan la detección temprana y certera de esta enfermedad, así como su posible tratamiento.

En la actualidad es bien aceptada la relación de los canales iónicos con diferentes aspectos de la biología del cáncer. Recientemente en nuestro laboratorio se demostró la presencia de canales de sodio dependientes de voltaje (CSDV) a nivel funcional por medio de la técnica de patch clamp en cultivos primarios de CaCu generado por VPH-16, y a nivel de mensajero utilizando RT-PCR estándar. También se determinó de forma cuantitativa, por medio de PCR en tiempo real, la expresión del mensajero de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los CSDV sensibles a la tetrodotoxina, tanto en cultivos primarios como en biopsias de CaCu generado por VPH-16, lo que permitió concluir que varios mensajeros se encuentran en mayor abundancia en el CaCu con respecto al cérvix no canceroso (CNC), principalmente los correspondientes a las subunidades  $Na_v1.6$  y  $Na_v1.7b$ .

El objetivo del presente trabajo de tesis fue determinar cuantitativamente la expresión del mRNA de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los CSDV presentes en biopsias de CaCu positivas a VPH-18, el segundo agente causal más frecuente de CaCu. Primero, mediante el empleo de la técnica de RT-PCR estándar se investigó la presencia del mensajero de  $Na_v1.6$  y de  $Na_v1.7$  tanto en biopsias de CaCu como en biopsias de CNC, lo cual indicó la presencia del mensajero de  $Na_v1.6$  en los casos de cáncer, mientras que no se detectó amplificado alguno en el tejido no canceroso. Por su parte, el mensajero de  $Na_v1.7$  no se observó en ninguna muestra analizada.

Por otro lado, con la técnica de PCR en tiempo real (un método más sensible y cuantitativo) se determinó la presencia de las subunidades  $\alpha$  que conforman los canales  $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.2$ ,  $Na_v1.3$ ,  $Na_v1.4$ ,  $Na_v1.5N$ ,  $Na_v1.5A$ ,  $Na_v1.6$ ,  $Na_v1.7a$  y  $Na_v1.7b$  y las cuatro subunidades auxiliares  $\beta$  descritas en la literatura ( $Na_v\beta1$  -  $Na_v\beta4$ ). De todas ellas, las subunidades  $Na_v1.6$  y  $Na_v1.7b$  presentaron una sobreexpresión en el CaCu-VPH18 con respecto las biopsias de CNC. Estos resultados son consistentes con los ya obtenidos para biopsias de CaCu-VPH16, lo cual sugiere que las subunidades  $Na_v1.6$  y  $Na_v1.7b$  pueden ser consideradas como marcadores moleculares para el diagnóstico y posible tratamiento de esta enfermedad.



## INTRODUCCIÓN

### **Cáncer Cervicouterino**

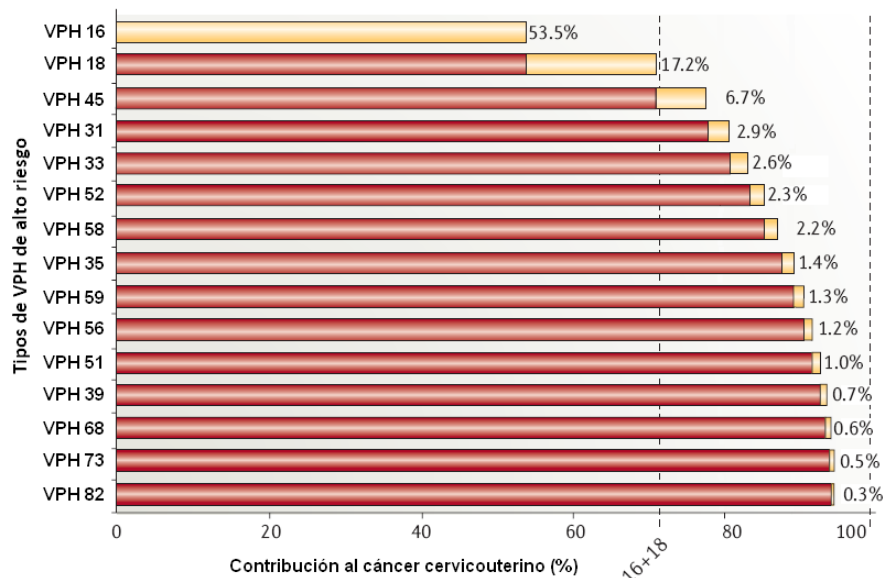
El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por un crecimiento anormal de células causado por cambios múltiples en la expresión génica que provocan un desequilibrio en la proliferación y muerte celular. Esto conduce al desarrollo de una población celular capaz de invadir tejidos circundantes e incluso diseminarse a otros órganos, lo cual puede llevar a la muerte del paciente. En general los diferentes tipos de cáncer causan una gran morbilidad y en la mayoría de los casos serán letales para el paciente si no es diagnosticado y tratado en etapas tempranas.

En particular, el cáncer cervicouterino (CaCu) es un problema de salud de primer orden a nivel mundial siendo el segundo más frecuente en mujeres alrededor del mundo y se estima que anualmente se presentan alrededor de 500,000 casos nuevos, así como 274,000 muertes debidas a esta enfermedad. Los países subdesarrollados como el nuestro son los responsables de más del 80% de estos casos (Hakim & Dinh, 2009). En México, aproximadamente cada dos horas muere una mujer por CaCu (Alonso De Ruiz & Lazcano, 2005).

Uno de los avances más significativos en el tema fue la identificación de la etiología del CaCu, al establecer la presencia del Virus de Papiloma Humano (VPH) hasta en el 99.7% de los carcinomas cervicales (Palacio-Mejia *et al.*, 2003; Palacio-Mejia *et al.*, 2009). A la fecha se conocen más de 100 tipos de VPH, siendo los tipo 16 y 18 los más frecuentes (denominados de alto riesgo), presentándose hasta en 70% de los casos de CaCu (Fig. 1) (Munoz *et al.*, 2003). Ello ha permitido conocer el papel del VPH en el desarrollo de lesiones premalignas y malignas del cuello uterino, lo cual ha tenido importantes implicaciones en la metodología de identificación, diagnóstico y tratamiento del CaCu. Sin embargo aún quedan muchas incógnitas sobre la biología de este cáncer.

## VPH y Desarrollo del CaCu

El Virus del Papiloma Humano es miembro de la familia Papillomaviridae, cuyos miembros se caracterizan por ser virus pequeños, con un genoma de DNA circular de doble cadena, y una cápside viral icosaédrica (Alonso De Ruiz & Lazcano, 2005; Campo, 2006). El genoma del VPH contiene únicamente 8 genes, de los cuales L1 y L2 son de expresión tardía y constituyen a la cápside viral, mientras que E6 y E7 codifican para las principales oncoproteínas. Estas proteínas tienen diversos blancos celulares que provocan, entre otras cosas, la inhibición de los supresores de tumores p53 y pRB (Schiffman *et al.*, 2007). En más del 90% de los carcinomas, el VPH se halla integrado en el DNA del huésped; dicha integración produce una inestabilidad cromosómica que, junto con la presencia de las proteínas E6 y E7, provocan una mayor predisposición a adquirir errores genéticos adicionales (Alonso De Ruiz & Lazcano, 2005).

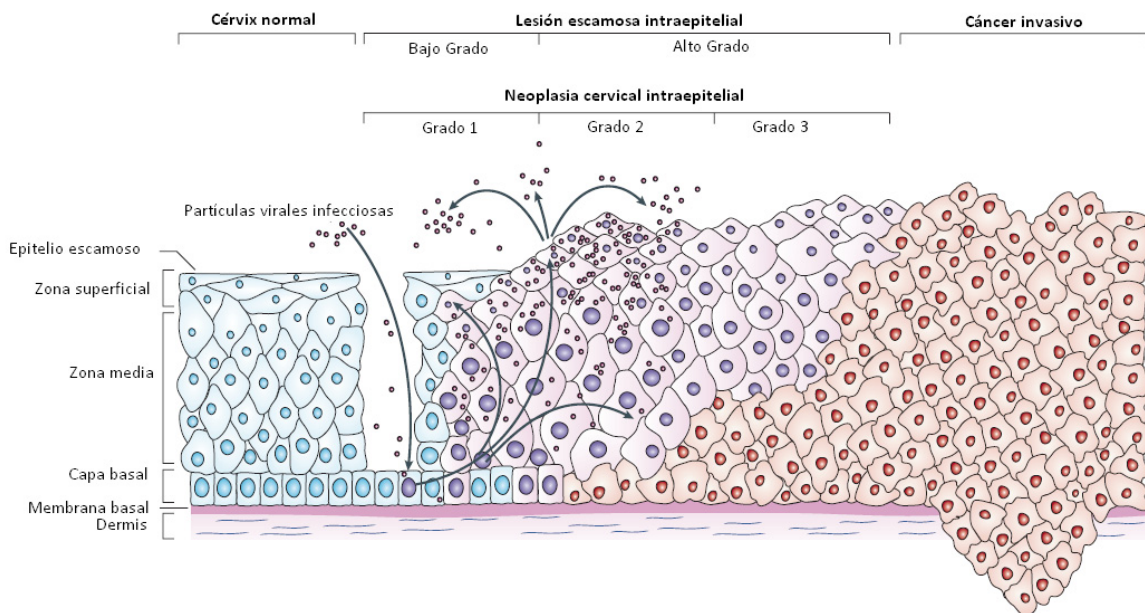


**Figura 1. Frecuencia acumulativa de genotipos de VPH presentes en CaCu.** Se muestran los principales tipos de VPH de alto riesgo asociados a la generación de CaCu. Las barras amarillas y los porcentajes junto a ellas indican el porcentaje de casos de CaCu atribuidos a cada genotipo de VPH, mientras que las barras rojas indican el porcentaje acumulativo de los casos de CaCu (Modificada de Roden & Wu, 2006).

La infección con VPH es muy común, y la mayoría de las veces es atacada eficazmente y eliminada con el tiempo. Sin embargo, aproximadamente el 15% de las mujeres no logra eliminar el virus por completo, lo que lleva a la infección persistente con alto riesgo de desarrollar cáncer (Stanley *et al.*, 2007). La transmisión del VPH se

genera principalmente por contacto piel con piel o mucosa con mucosa, siendo el contacto sexual la primera causa de infección.

El CaCu surge a partir de una vía de cuatro pasos: transmisión del VPH, persistencia viral, progresión de una clona con infección persistente a precáncer, e invasión a través de la membrana basal del epitelio (Schiffman *et al.*, 2007). El virus se conduce a través de microlesiones en el epitelio cervical e infecta a las células basales, parabasales o de reserva que se pueden dividir y diferenciar en epitelio escamoso, glandular o neuroendócrino (Fig. 2) (Alonso De Ruiz & Lazcano, 2005).



**Figura 2. Progresión del CaCu mediado por VPH.** Las células basales del epitelio cervical se encuentran fijadas a la membrana basal, que está soportada por la dermis. El virus del papiloma humano llega a las capas basales a través de microlesiones en el epitelio cervical. Seguida de la infección, los genes de expresión temprana se expresan y el genoma viral se replica en forma episomal (núcleos morados). En la zona media y la zona superficial el genoma viral se replica de forma más abundante y se expresan las proteínas de expresión tardía que forman la cápside viral generando viriones que son liberados y que pueden infectar otras células. Algunas infecciones con VPH de alto riesgo progresan a una neoplasia cervical intraepitelial de alto grado. La progresión de estas lesiones a un cáncer invasivo está asociada con la integración del genoma viral dentro del cromosoma del hospedero (núcleos rojos) (Modificada de Woodman *et al.*, 2007).

El VPH-16 es el principal causante de carcinomas de células escamosas, y generan cambios citológicos muy evidentes, mientras que el VPH-18 es mayormente asociado con la generación de adenocarcinomas (carcinoma que tiene su origen en células glandulares), los cuales no son tan evidentes a simple vista y esto provoca que no sean detectados tan fácilmente durante un estudio por colposcopia o que la gravedad de la enfermedad sea subestimada (Woodman *et al.*, 2007). Esta es la causa principal por la que el porcentaje de los casos de CaCu generado por VPH-18 está subiendo, a la par que descienden los casos de CaCu producido por VPH-16 en países donde se tiene buenos programas de detección temprana. Por otro lado, el VPH-18 está asociado a una progresión a neoplasia cervical más rápida y agresiva que aquella generada por VPH-16 (Arends *et al.*, 1995), aunque los mecanismos por los cuales se produce este efecto siguen siendo un misterio.

### **Vacunas Contra el CaCu**

A la fecha se han desarrollado dos vacunas profilácticas contra el VPH: una tetravalente que protege contra los VPH tipos 16, 18, 6 y 11 (GARDASIL, Merck Sharp and Dohme), y una divalente que genera protección contra VPH tipos 16 y 18 (CERVARIX, Glaxo SmithKline). Ambas vacunas están compuestas por proteínas L1 de VPH autoensambladas en partículas parecidas a los virus, que no tienen carácter infeccioso. Ambas son producidas en diferentes células, contienen diferentes adyuvantes, y se administran por medio de inyecciones intramusculares en 3 dosis dentro de un periodo de 6 meses a partir de la primera administración (Roden & Wu, 2006; D'Andrilli *et al.*, 2010). Tanto GARDASIL como CERVARIX han sido aprobadas por la FDA (Food and Drug Administration) de los Estados Unidos de América, y actualmente están disponibles en varios países, en donde se recomienda que se administre a niñas y a mujeres jóvenes (de 9 a 26 años) y preferentemente antes de iniciar una vida sexual activa (Villa, 2010).

A pesar de que los resultados del uso de estas vacunas son muy prometedores, los beneficios clínicos a largo plazo sólo podrán ser evidentes dentro de varias décadas (Demarteau *et al.*, 2010). Debido al costo de estas vacunas, resulta complicada su

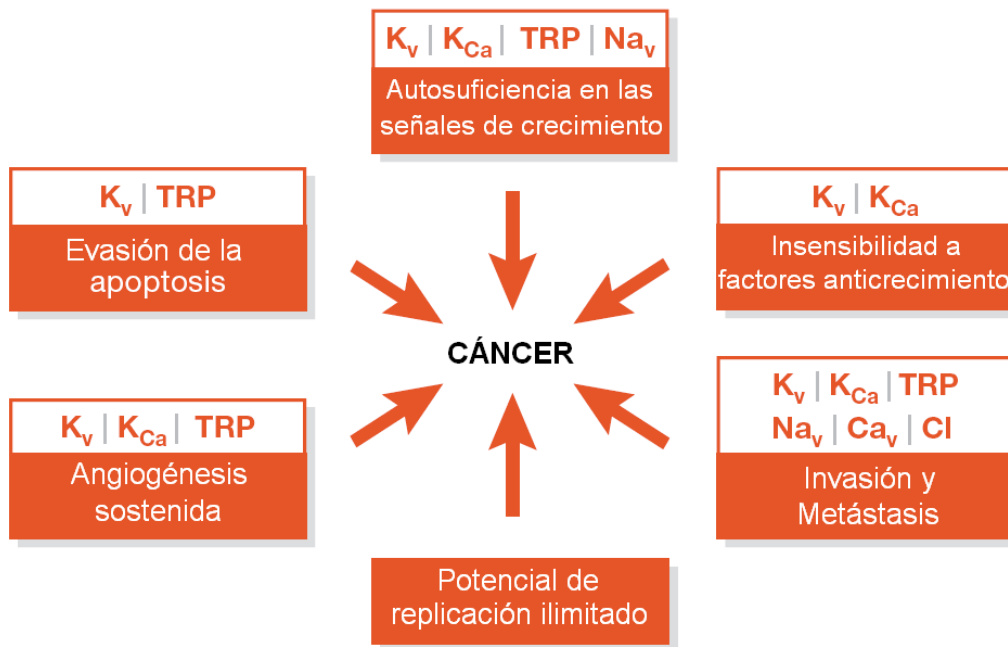
administración gratuita en países en vías de desarrollo, que es donde hay una mayor prevalencia de CaCu. Aunado a ello, no se debe olvidar que estas vacunas no confieren protección contra todos los tipos de VPH de alto riesgo, y que existe la posibilidad de que haya un desplazamiento viral y aumenten los casos de CaCu generados por los tipos de VPH para los cuales las vacunas no generan protección (Villa, 2010). En consecuencia, existe una necesidad imperante en el tema del CaCu, así como de varios tipos más de carcinomas, para el descubrimiento de nuevos marcadores moleculares que permitan realizar una detección más acertada y temprana del cáncer, de tal manera que se incrementen las posibilidades de tratar y curar esta enfermedad.

Se sabe que durante el desarrollo del cáncer suceden cambios importantes en las células que llevan a la expresión genética diferencial con respecto a los tejidos normales, lo cual les confiere las características que las identifica como cancerosas. Entre una gran cantidad de proteínas que sufren tales cambios, se encuentran los canales iónicos, complejos proteicos presentes en las membranas plasmáticas e intracelulares, y que son de fundamental importancia ya que se han asociado a diferentes características cruciales en el desarrollo del cáncer (Fig. 3; Fraser & Pardo, 2008; Prevarskaya *et al.*, 2010). Por ello, para los fines de esta disertación, nos enfocaremos en los cambios que se presentan en la expresión de los canales iónicos dependientes de voltaje y en particular en aquellos que transportan el ión sodio de manera selectiva. Para un mejor entendimiento del tema, en los siguientes párrafos se describen las particularidades de dichos canales y más adelante su relación con el CaCu.

### **Canales Iónicos Dependientes de Voltaje**

La superfamilia de canales iónicos dependientes de voltaje (CIDV) comprende a los canales de sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y cloruro ( $\text{Cl}^-$ ), los cuales comparten similitudes funcionales y estructurales (Hille, 2001). Estos canales se encuentran principalmente en células excitables (neuronas, células musculares y células endócrinas), en las cuales son responsables de la generación de potenciales de acción

(Alberts *et al.*, 2008). No obstante, el transporte de iones a través de los CIDV repercute en múltiples funciones celulares que abarcan desde la misma excitabilidad celular hasta la regulación génica, así como en la proliferación celular, la migración e invasividad (Hille, 2001; Prevarskaya *et al.*, 2010). En términos generales, los CIDV están compuestos por una subunidad principal  $\alpha$  codificada por un solo gen que contiene varios dominios transmembranales, formando un poro acuoso que, en respuesta a cambios en el potencial de membrana, puede transitar de un estado cerrado a uno abierto y viceversa (Aidley & Stanfield, 1996). Además de la subunidad principal, los canales iónicos pueden asociarse a otras proteínas llamadas subunidades auxiliares o regulatorias que pueden modificar el comportamiento del canal (Hille, 2001).



**Figura 3. Papel de los canales iónicos en el cáncer.** Se muestra un diagrama esquemático que ilustra la participación de los canales iónicos en varios aspectos del cáncer.  $K_v$ , canal de potasio dependiente de voltaje;  $K_{Ca}$ , canal de potasio activado por calcio,  $Ca_v$ , canal de calcio dependiente de voltaje; TRP, canales no dependientes de voltaje activados por temperatura, entre otros factores (Modificada de Fraser & Pardo, 2008).

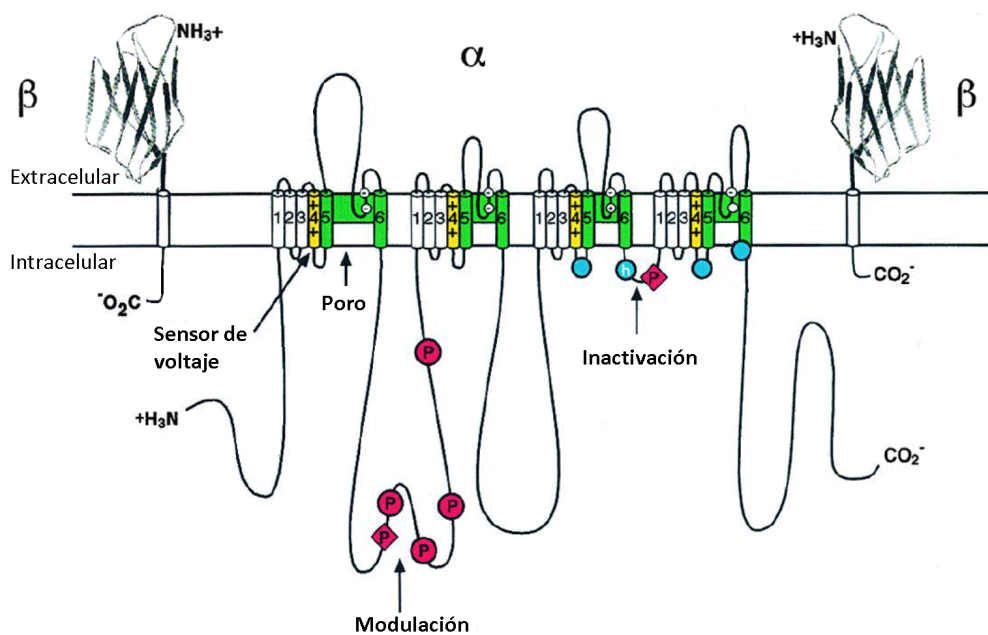
### **Canales de Sodio Dependientes de Voltaje**

Los canales de sodio dependientes de voltaje (CSDV) son proteínas transmembranales esenciales para la generación de potenciales de acción en células excitables, incluyendo nervios, músculos y células neuroendócrinas. Estos canales consisten de una subunidad principal  $\alpha$  de aproximadamente 260 kDa que puede estar asociada a una o más subunidades auxiliares  $\beta$  (30-40 kDa), las cuales modifican las propiedades biofísicas de la subunidad  $\alpha$ , como su cinética y dependencia al voltaje, así como del tráfico de ésta a la membrana plasmática (Catterall *et al.*, 2005). Evidencias más recientes indican que las subunidades  $\beta$  tienen funciones adicionales como moléculas de adhesión, a través de la interacción con la matriz extracelular y el citoesqueleto, lo cual podría repercutir en las propiedades de migración celular (Brackenbury & Isom, 2008; Brackenbury *et al.*, 2008a; Chioni *et al.*, 2009).

La subunidad principal  $\alpha$  de los CSDV es una proteína de aproximadamente 2000 aminoácidos, organizada en cuatro dominios similares entre sí (I-IV), cada uno de los cuales está formado por seis segmentos transmembranales (S1-S6) unidos por asas intra y extracelulares. Los segmentos S5 y S6 de cada dominio forman el poro del canal, y las asas que unen a dichos segmentos, denominadas asas del poro, forman el vestíbulo externo del canal y el filtro de selectividad. Por otro lado, el segmento S4 de cada dominio contiene residuos cargados positivamente cada tres aminoácidos. Estos residuos sirven como sensores de voltaje que se desplazan físicamente para producir la activación (apertura) del canal como respuesta a la despolarización de la membrana. El asa intracelular que une a los dominios III y IV funciona como compuerta de inactivación (estado no conductor del canal abierto) plegándose dentro de la estructura del canal y bloqueando el poro desde la parte interna (Fig. 4.) (Catterall, 2000).

A diferencia de los canales de calcio y de potasio, los diferentes canales de sodio dependientes de voltaje tienen propiedades funcionales muy similares. Actualmente se conocen 9 genes que codifican para diferentes subunidades  $\alpha$  de estos canales, los cuales se encuentran dentro de una misma familia;  $Na_v1$  ( $Na_v1.1$  -  $Na_v1.9$ ), y que comparten más de 50% de homología en su secuencia de aminoácidos (Fig. 5).

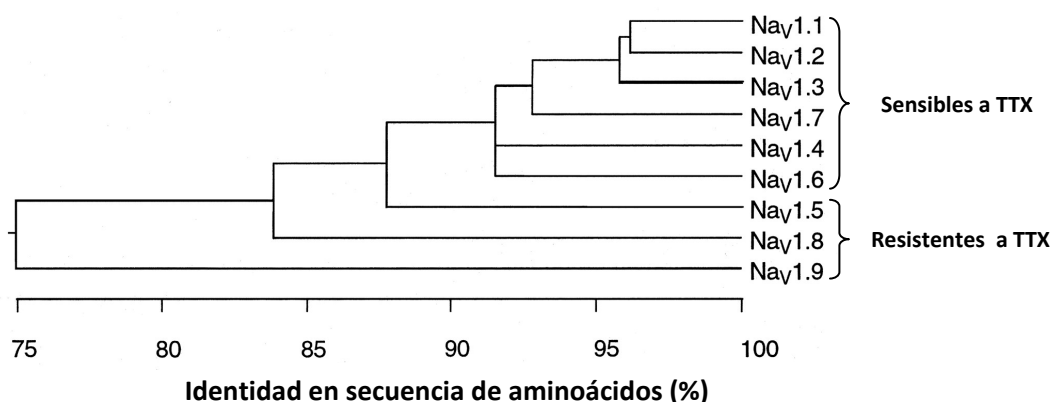
Diversas neurotoxinas actúan sobre los CSDV provocando diferentes efectos. La tetrodotoxina (TTX) y la saxitoxina (STX) son dos toxinas cuyos efectos han sido ampliamente estudiados y se conoce que se unen a la región externa del poro, bloqueando el flujo de iones a través del canal. Las diferencias en la sensibilidad a la TTX que presentan los CSDV permiten clasificarlos en dos grandes grupos: los sensibles a la TTX ( $\text{Na}_v1.1$ ,  $\text{Na}_v1.2$ ,  $\text{Na}_v1.3$ ,  $\text{Na}_v1.4$ ,  $\text{Na}_v1.6$  y  $\text{Na}_v1.7$ ), cuya corriente es bloqueada con concentraciones de TTX en el orden nanomolar; y los resistentes a la TTX ( $\text{Na}_v1.5$ ,  $\text{Na}_v1.8$  y  $\text{Na}_v1.9$ ), que requieren concentraciones en el orden micromolar para que sea bloqueado el flujo de sodio a través de ellos (Fig. 5.) (Aidley & Stanfield, 1996).



**Figura 4. Representación esquemática de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los canales de sodio dependientes de voltaje.** Se muestran los cuatro dominios de la subunidad principal  $\alpha$ , cada uno de ellos con sus seis segmentos transmembranales. En verde se resaltan los segmentos S5 y S6 formadores del poro. En amarillo los segmentos S4, formadores del sensor de voltaje. Se señala el asa III-IV, responsable de la inactivación del canal, y en rojo se muestran los posibles sitios de fosforilación. Además están representadas dos subunidades accesorias  $\beta$  con un solo dominio transmembranal cuyo carboxilo terminal se encuentra en la región intracelular (Modificada de Catterall, 2000).



Por su parte, las subunidades accesorias  $\beta$  son proteínas transmembranales con un extremo amino extracelular, un solo segmento transmembranal y el extremo carboxilo de forma intracelular. El dominio extracelular es muy prominente y estructuralmente es homólogo a la superfamilia de las inmunoglobinas, dentro de las cuales se encuentran las moléculas de adhesión celular tales como la contactina (Isom, 2001). A la fecha se conocen cuatro de estas subunidades:  $\text{Nav}\beta 1$ ,  $\text{Nav}\beta 2$ ,  $\text{Nav}\beta 3$  y  $\text{Nav}\beta 4$ . Cada una de estas subunidades modula a los canales de sodio de forma tejido-específica debido a las diferentes características cinéticas y de distribución en los tejidos (Tseng *et al.*, 2007).



**Figura. 5. Similitud en la secuencia de aminoácidos de los diferentes CSDV.** Se muestra a manera de porcentaje la identidad en la secuencia de aminoácidos de las diferentes subunidades  $\alpha$  de los CSDV. Además se señalan aquellos sensibles a la toxina TTX y los resistentes a la misma (Modificada de Catterall *et al.*, 2003).

### Canales Iónicos y Cáncer

El concepto de la participación de los canales iónicos en una progresión anormal de la diferenciación, proliferación y apoptosis celular surgió a finales de la década de 1980, cuando se encontró que el uso de bloqueadores típicos de algunos canales, en especial canales de calcio y potasio, eran capaces de inhibir la proliferación celular o la apoptosis *in vitro*. En los últimos veinte años ha habido un gran progreso en la identificación molecular de estos canales, así como en las herramientas que permiten su manipulación para el estudio de estas proteínas y que han confirmado los primeros hallazgos, además de abrir las puertas al estudio de su relación con otros procesos

característicos del cáncer, tales como la angiogénesis, la migración y la capacidad invasiva (Prevarskaya *et al.*, 2010).

En la actualidad existe una considerable cantidad de trabajos que relacionan la expresión funcional de los canales iónicos en ciertos tipos de cáncer y su posible uso para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad. A continuación se revisarán brevemente algunas de las evidencias que permitieron establecer dicha relación.

### **Canales de Potasio**

Algunos canales de potasio han sido relacionados con la proliferación celular en diversos tipos de cáncer, entre los que podemos encontrar el  $K_V10.1$  y  $K_{Ca}3.1$  en el cáncer de mama y en melanoma, donde se sabe que estos canales juegan un papel importante en el paso de la fase G1 a la fase S del ciclo celular (Meyer *et al.*, 1999; Ouadid-Ahidouch *et al.*, 2000). También los canales  $K_V1.5$ ,  $K_V3.4$  y  $K_V10.1$  inducen en el cáncer de colon la proliferación celular posiblemente a través de la regulación del pH intracelular o la entrada de  $Ca^{2+}$  (Ousingsawat *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha asociado a los canales de potasio con la capacidad invasiva en líneas celulares de cáncer de próstata al encontrar que existe una mayor densidad de corriente en aquellas células con bajo potencial metastásico tales como LNCaP y AT-2, en comparación con las PC-3, las cuales son fuertemente metastásicas (Laniado *et al.*, 2001). Las propiedades antitumorales de los canales de potasio también se han descrito en osteosarcomas, donde el silenciamiento del canal *hSlo* mediante RNAs de interferencia (siRNAs) promueve la tumorigénesis de la línea celular Cal72 OS (Cambien *et al.*, 2008).

También se ha reportado que el canal de potasio *éther a-go-go* (EAG), cuya expresión normalmente es exclusiva en tejidos de origen neural, se encuentra presente en alrededor del 80% de los tumores humanos de diversos orígenes, y que al inhibir su expresión se produce una disminución en la proliferación (Farias *et al.*, 2004; Pardo *et al.*, 2005).

### **Canales de Calcio**

La regulación de la concentración de calcio intracelular es un mecanismo de señalización importante para la proliferación celular tanto en células normales como en células cancerosas. Los canales de calcio dependientes de voltaje se expresan en una amplia variedad de tipos de cáncer, y el papel que éstos juegan en la progresión de la enfermedad es un área que en la actualidad es objeto de un número importante de trabajos de investigación. De esta forma se ha encontrado la sobreexpresión del mensajero del canal de calcio tipo T ( $Ca_v3.2$ ) en la línea celular LNCaP de cáncer de próstata durante su diferenciación neuroendocrina (Mariot *et al.*, 2002) y el bloqueo de estos canales produce una disminución de la proliferación celular y un aumento en la apoptosis en líneas celulares de cáncer de mama (Taylor *et al.*, 2008a; Taylor *et al.*, 2008b). Al parecer existe una relación positiva entre la expresión de canales de calcio tipo T y la inhibición de la proliferación celular, ya que las células C6 (un glioma de rata), que muestran baja expresión de estos canales, no son mayormente afectadas en su tasa de proliferación con el uso de bloqueadores de canales tipo T (Bertolesi *et al.*, 2002).

Por otro lado, se ha reportado que la cantidad y localización celular del canal  $Ca_v1.2$  aumenta y se modifica en los casos de cáncer de colon en comparación con el tejido no canceroso (Wang *et al.*, 2000). Por su parte, Oguro-Okano y colaboradores (1992), mediante RT-PCR estándar determinaron la presencia del mRNA de los canales de calcio tipo P y tipo L en carcinomas pulmonares de células pequeñas. De igual forma, otros canales de calcio han sido relacionados con neuroblastomas, fibrosarcomas, leucemia y cáncer de mama; en donde desempeñan un papel fundamental en funciones tales como la proliferación, invasión, secreción y regulación de la expresión génica (Oguro-Okano *et al.*, 1992; Morton *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2008a; Taylor *et al.*, 2008b).

### **Canales de Sodio**

En lo que respecta a los canales de sodio dependientes de voltaje, el equipo de Mustafa Djamgoz en Londres, ha reportado que únicamente en las líneas celulares

altamente metastásicas de cáncer de próstata hay corrientes de sodio, y que el canal que se encuentra en mayor proporción es  $Na_v1.7$ , lo cual indica que muy probablemente es el principal responsable de las corrientes observadas. Al inhibir las corrientes de sodio en estas células utilizando TTX, su capacidad invasiva se redujo en un 33% (Grimes *et al.*, 1995; Laniado *et al.*, 1997; Diss *et al.*, 2005). En un estudio más detallado observaron que la galvanotaxis (habilidad de las células para moverse de forma direccional como respuesta a un campo eléctrico) de las líneas celulares de cáncer de próstata altamente metastásicas está controlada por la actividad de los CSDV, pues en un campo eléctrico, la migración de estas células fue eliminada al bloquear las corrientes de sodio con TTX, mientras que al agregar veratridina (activador de los canales de sodio), esta migración aumentó (Djamgoz *et al.*, 2001).

En líneas celulares de cáncer de mama se encontró que las células MDA-MB-231, altamente metastásicas, presentan corrientes de sodio, mientras que las líneas MCF-7 y MDA-MB-468, que son poco metastásicas o no metastásicas, no presentan dicha corriente. Al igual que en el cáncer de próstata, todo indica que los CSDV participan en la capacidad invasiva confiriendo un mayor potencial metastásico, ya que en la línea celular MDA-MB-231 se observa una disminución en la invasividad al bloquear los canales con TTX (Roger *et al.*, 2003; Fraser *et al.*, 2005). En este tipo de cáncer, sin embargo, el canal que se encuentra expresado en mayor cantidad es la variante neonatal de  $Na_v1.5$ , originada por el procesamiento alternativo del mensajero. Esta variante de  $Na_v1.5$ , al igual que otras subunidades de los CSDV, también se encuentra sobreexpresada en el cáncer de ovario, según se ha reportado recientemente (Gao *et al.*, 2010). De igual forma, en dicho estudio se encontró que existe una relación positiva entre la cantidad y actividad de estos canales y la capacidad invasiva de líneas celulares de cáncer de ovario.

Aunado a ello, también se ha observado que los CSDV se encuentran sobreexpresados en otros tipos de cáncer, incluyendo al cáncer de pulmón (tanto en células pequeñas como en no pequeñas), leucemia, colon y CaCu (Roger *et al.*, 2006; Diaz *et al.*, 2007; Roger *et al.*, 2007; House *et al.*, 2010). Algunos de estos estudios

sugieren que los CSDV juegan un papel importante en la movilidad e invasividad celular, sin embargo, los mecanismos involucrados no se conocen aún por completo. Interesantemente, a excepción del cáncer de próstata, en el resto de los tipos de cáncer estudiados, el canal de sodio vinculado directamente con los efectos inhibitorios de la tumorigénesis, ha sido el  $Na_v1.5$ , en su versión neonatal.

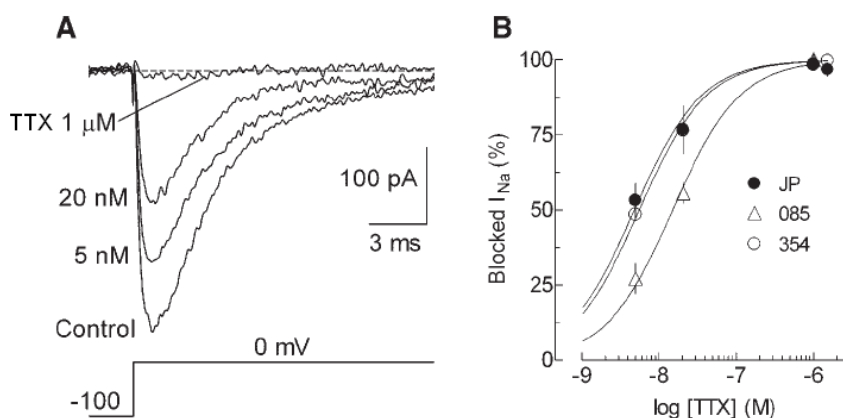
### **Cáncer Cervicouterino y Canales Iónicos**

Contrario a lo que sucede en otros tipos de cáncer como de próstata y mama, a la fecha no existe mucha información sobre la participación de canales iónicos en la biología del CaCu. Recientemente, se reportó que en la línea celular SiHa (de CaCu, positiva para VPH-16), al bloquear las corrientes de los canales de potasio dependientes de voltaje con tetra-etil-amonio (TEA), la proliferación celular se inhibe en forma dosis-dependiente (Han *et al.*, 2006). Un par más de estudios realizados en las líneas celulares SiHa y HeLa (esta última también de CaCu, aunque positiva para VPH-18), han encontrado una relación de la actividad de canales de cloruro activados por volumen con la proliferación celular de la enfermedad (Shen *et al.*, 2000; Mao *et al.*, 2009).

Por otro lado, el grupo del Dr. Javier Camacho aquí en nuestro país (Farias *et al.*, 2004), reportó la presencia de corrientes de potasio prominentes debidas a la actividad del canal *ether a-go-go* y la abundante presencia del mensajero en células de cultivos primarios de CaCu. Estos resultados pioneros permitieron proponer al canal *EAG* como un potencial marcador molecular del CaCu.

## ANTECEDENTES INMEDIATOS

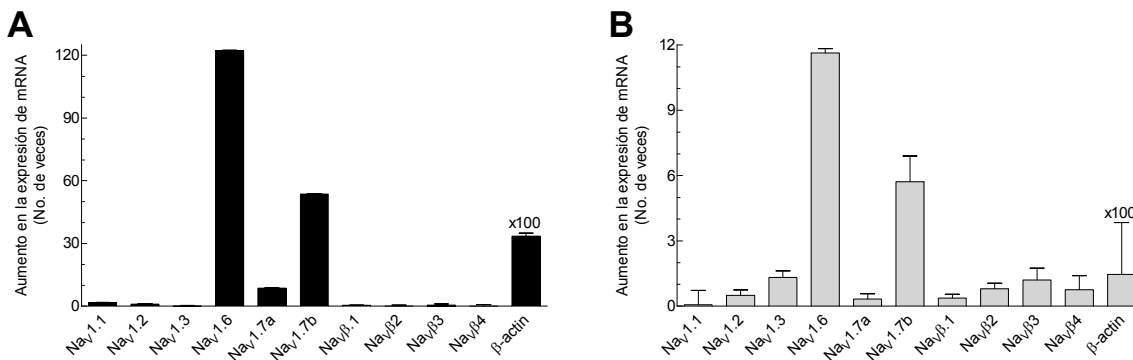
Recientemente, en nuestro laboratorio se identificó, tanto a nivel molecular como electrofisiológico, la presencia de CSDV en cultivos primarios de CaCu positivos para VPH-16. Estos cultivos primarios (nombrados JP, 085 y 354), proporcionados amablemente por el grupo del Dr. Camacho, expresaron corrientes de sodio, mismas que fueron inhibidas por completo con concentraciones de 1  $\mu\text{M}$  de TTX, lo cual indica que los canales que transportan estas corrientes pertenecen principalmente al grupo de CSDV sensibles a la TTX (Fig. 6) (Diaz *et al.*, 2007).



**Figura. 6. Bloqueo de la corriente de sodio por TTX en cultivos primarios de CaCu. A:** Trazos representativos de corrientes de sodio a 0 mV en presencia de las concentraciones indicadas de TTX en una célula del cultivo primario 085. Se observa que a la concentración de 1  $\mu\text{M}$  de la toxina se inhibe por completo la corriente de sodio. **B:** Curva dosis-respuesta para el bloqueo de la corriente de sodio en función de la concentración de TTX en los tres cultivos primarios de CaCu (Diaz *et al.*, 2007).

Posteriormente, en su trabajo de maestría, Everardo Hernández Plata (estudiante del laboratorio del Dr. Gómora), analizó la expresión diferencial de los CSDV sensibles a TTX y las subunidades  $\beta$  con la técnica de RT-PCR en tiempo real tanto en los cultivos primarios JP, 085 y 354, como en biopsias de CaCu positivas para VPH-16. Los resultados de Hernández Plata (2008) mostraron que existe una sobreexpresión del mRNA de los CSDV en los casos de CaCu (tanto en biopsias como en cultivos primarios) y que la subunidad  $\text{Na}_v1.6$  es la que presenta el mayor aumento con respecto a los controles de cérvix no canceroso (más de cien veces en los cultivos primarios y más de diez veces en las biopsias de CaCu). Otra subunidad que también se sobreexpresa de manera considerable es una isoforma del canal  $\text{Na}_v1.7$  cuya

secuencia difiere de las reportadas hasta ahora en humano, por lo tanto, dicha isoforma fue designada como  $Na_V1.7b$  (Fig. 7), y la secuencia reportada previamente en el *GenBank* con el número de acceso X82835, se denominó  $Na_V1.7a$ .



**Figura. 7. Expresión diferencial de los CSDV en CaCu generado por VPH-16.** Se muestra la expresión diferencial de los CSDV sensibles a TTX, así como de las subunidades  $\beta$ , en los cultivos primarios JP, 085 y 354 (A) y en biopsias de CaCu positivas para VPH-16 (B) con respecto a cérvix no canceroso (Adaptada de Hernández Plata, 2008).

De acuerdo a estos resultados se puede proponer a la subunidad  $Na_V1.6$  como un marcador molecular para la detección temprana de CaCu generado por VPH-16 y como posible blanco terapéutico. Otro resultado relevante de los estudios con biopsias positivas a VPH-16, lo constituye el hecho de que la proteína del canal  $Na_V1.6$  sufre cambios en su distribución celular en el CaCu y se localiza tanto en la membrana plasmática como en compartimientos intracelulares (Hernandez-Plata *et al.*, 2011), a diferencia del cérvix no canceroso, en el que su ubicación se limita a la membrana plasmática. Por ello, resulta necesario investigar la presencia del mRNA de CSDV resistentes a la TTX (como el  $Na_V1.5$ ) en el CaCu, ya que aunque no se han encontrado evidencias de corrientes iónicas generadas por este tipo de canales en la membrana plasmática de cultivos primarios de CaCu (Diaz *et al.*, 2007), cabría la posibilidad de que su expresión se limitara a algún compartimiento intracelular. Aunado a lo anterior, hasta el momento no se tiene información sobre la expresión de CSDV en el CaCu generado por otro tipo de VPH, por ello en el presente trabajo se analizó la expresión diferencial de los CSDV en el CaCu generado por VPH-18 (el segundo más frecuente en los casos de CaCu) con respecto al cérvix no canceroso, y se realizó la comparación con los resultados ya obtenidos para CaCu generado por VPH-16.

## HIPÓTESIS

Los niveles de mRNA de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los canales de sodio dependientes de voltaje, presentes en cáncer cervicouterino generado por el virus del papiloma humano tipo 18, son cuantitativamente diferentes con respecto al cérvix no canceroso.

## OBJETIVO

Determinar cuantitativamente la expresión del mRNA de las subunidades  $\alpha$  de CSDV sensibles a tetrodotoxina, así como de las subunidades accesorias  $\beta$  de los CSDV presentes en biopsias de CaCu positivas a VPH-18.

### Objetivos Particulares

- Cuantificar la expresión relativa del mRNA de las subunidades  $\alpha$  sensibles a TTX ( $\text{Na}_V1.1$ ,  $\text{Na}_V1.2$ ,  $\text{Na}_V1.3$ ,  $\text{Na}_V1.4$ ,  $\text{Na}_V1.6$  y  $\text{Na}_V1.7$ ) y de las cuatro subunidades  $\beta$  de los CSDV ( $\text{Na}_V\beta1$ ,  $\text{Na}_V\beta2$ ,  $\text{Na}_V\beta3$  y  $\text{Na}_V\beta4$ ) en biopsias de CaCu positivas a VPH-18, así como en biopsias de cérvix no canceroso.
- Investigar en las mismas muestras biológicas la expresión relativa de la subunidad  $\text{Na}_V1.5$ , tanto la variante adulta como la neonatal.
- Determinar la abundancia relativa de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los CSDV expresados en CaCu generado por VPH-18, en relación con el cérvix no canceroso.
- Realizar la comparación de la expresión de CSDV en biopsias positivas para VPH-18 y los resultados ya obtenidos con biopsias positivas para VPH-16.



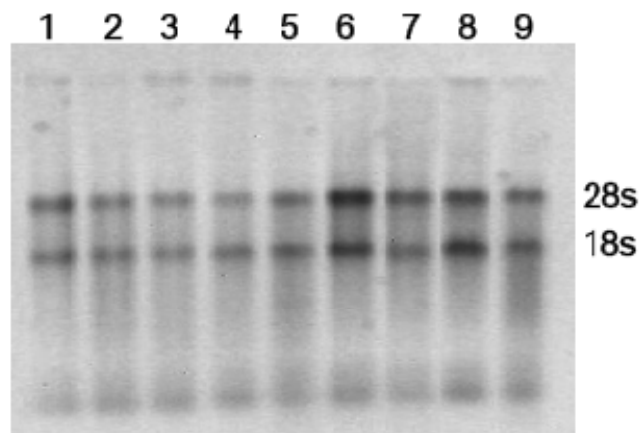
## METODOLOGÍA

### Obtención de RNA de Muestras Biológicas

En colaboración con el Dr. Jaime Berumen, del Hospital General de México, se obtuvo RNA total de biopsias de pacientes con cáncer cervicouterino positivas para el VPH-18, diagnosticadas en la Unidad de Oncología del mismo Hospital. Únicamente se incluyeron muestras de pacientes que no habían recibido ninguna terapia anticancerígena, ni tratamiento quirúrgico alguno. En todos los casos, las biopsias se obtuvieron previo consentimiento de los pacientes. Asimismo, se obtuvo RNA total de biopsias de cérvix no canceroso (CNC), provenientes de histerectomías por patologías diferentes al cáncer con el fin de utilizarlas como controles. En el presente estudio se utilizaron 6 biopsias de CaCu-VPH18, dos de estadio I, dos de II y dos de III (FIGO; Quinn *et al.*, 2006); las edades de las pacientes variaron entre 38 y 70 años. En ambos casos la extracción de RNA se llevó a cabo por el método de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). La concentración de las muestras de RNA fue determinada con ayuda de un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), y su integridad fue evaluada por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (Fig. 8). Todas las muestras fueron almacenadas a -80 °C para su uso posterior.

### RT-PCR Estándar o de Punto Final

La identificación del mensajero de las subunidades Na<sub>v</sub>1.6 y Na<sub>v</sub>1.7 en las muestras de CNC y en las biopsias positivas para VPH-18 se realizó por medio de reacciones estándar de transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Para ello se utilizó el kit *One Step* (Invitrogen) con oligonucleótidos (*primers*) específicos para dichas subunidades. La información de los *primers* utilizados se presenta en la Tabla 1.



**Figura 8. Separación electroforética del RNA total extraído de biopsias de CaCu positivas a VPH-18.** Se muestra la imagen de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio; en cada carril se depositaron de 400 a 700 ng de RNA total. Los carriles 1- 4 corresponden a biopsias de cérvix no canceroso, y los cinco restantes (5 - 9) conciernen a biopsias de CaCu positivas para VPH-18. Nótese la integridad de las dos fracciones de RNA ribosomal esperadas (28s y 18s).

**Tabla 1. *Primers* empleados en las reacciones de RT-PCR estándar.**

mRNA	No. acceso en el <i>GenBank</i>	Secuencia de los <i>primers</i> (5' → 3')	Tamaño del cDNA (pb)	Temperatura de Alineamiento
Na <sub>v</sub> 1.6	AF225988	F: AGGCCGATGGCAGTCATCG R: AAGCCTTTGGTGCCATTTTCAAG	784	65 °C
Na <sub>v</sub> 1.7	NM_002977	F: GACCCGTGGAAGTGGCTGGA R: CTTGCTCTTTTTTAAGACGGTC	748	65 °C
β-actina	NM_001101	F: GCTCGTCGTCGACAACGGCTC R: CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC	353	60 °C

Se presentan las secuencias de los *primers* (F: sentido; y R: antisentido). Para cada par de *primers* se indica el mRNA blanco, el número de acceso en el *GenBank*, la longitud (en pares de bases) del cDNA esperado, así como la temperatura óptima de alineamiento.

Todos los *primers* fueron diseñados en nuestro laboratorio utilizando el programa DNAsis Max (MiraiBio, Inc.; Alameda, CA). Como controles positivos para Na<sub>v</sub>1.6 y Na<sub>v</sub>1.7 se utilizó RNA del cultivo primario JP y de la línea celular comercial IMR32 respectivamente, siendo JP de origen cervical canceroso positivo para VPH-16, mientras que IMR32 proviene de neuroblastoma (ATCC, Manassas, VA).

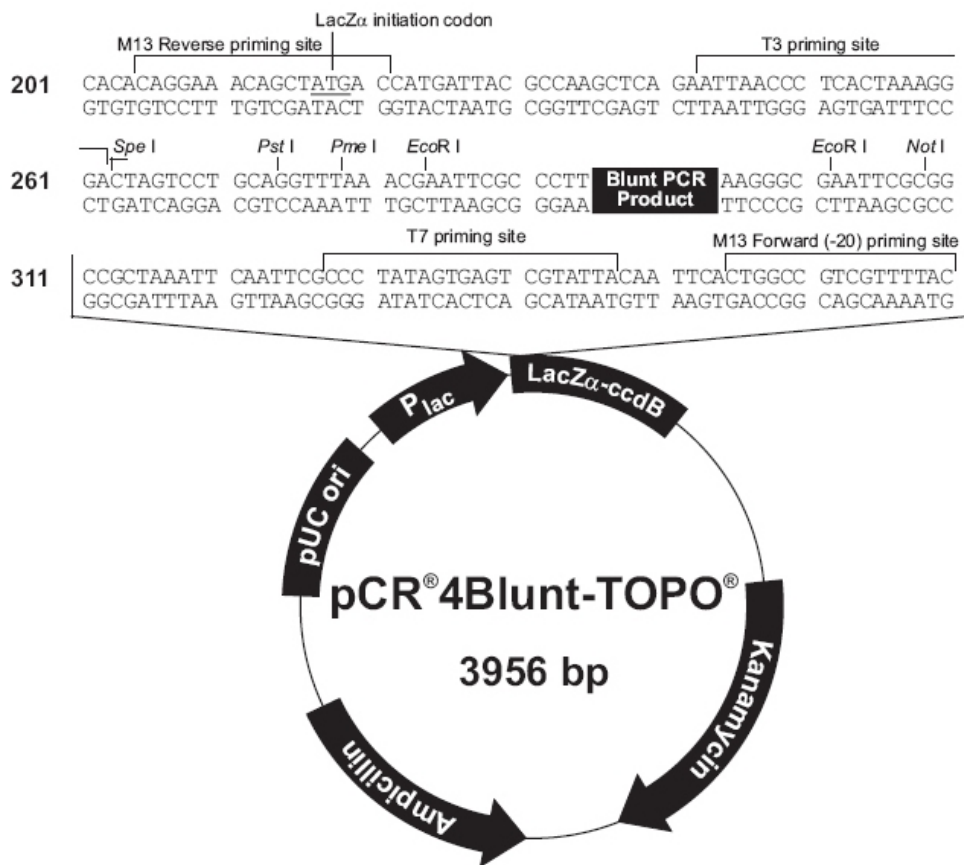
Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo en un termociclador programable de 96 pozos Veriti (Applied Biosystems) en un volumen final de reacción de 25  $\mu$ L utilizando 150 ng de RNA total, 0.5  $\mu$ L de la mezcla de enzimas RT/Platinum Taq,  $\sim$ 0.2-0.5  $\mu$ M de cada *primer* y 12.5  $\mu$ L de mix de reacción 2X, que a su vez contiene 0.4 mM de cada deoxinucleótido trifosfatado (dNTP) y 2.4 mM de MgSO<sub>4</sub>. El programa de ciclado térmico al cual fueron sometidas las mezclas de reacción se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2. Protocolo de amplificación utilizado en las reacciones de RT-PCR estándar.**

Paso	No. de ciclos	Temp (°C)	Tiempo	Proceso
1	1	50	30 min	Formación de cDNA
2	1	94	2 min	Desnaturalización inicial
3	1	94	15 s	Desnaturalización
4	1	60-65	30 s	Alineamiento
5	1	72	30 s	Elongación
6	Repetir pasos 3 al 5 por 40 ciclos			
7	1	72	7 min	Elongación final
8	1	4	$\infty$	Conservación

Los productos amplificados en la reacción de RT-PCR para Na<sub>v</sub>1.6 fueron clonados para ser secuenciados y de esta manera corroborar su identidad molecular. Para ello se utilizó el vector de clonación pCR 4Blunt-TOPO del kit *Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing* (Invitrogen) (Fig. 9).

Se usaron 3  $\mu$ L de la reacción de RT-PCR y se subclonó en el vector con presencia de sales de Mg<sup>2+</sup> para hacer más eficiente la reacción. Los plásmidos obtenidos se utilizaron para transformar bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  calcio competentes generadas en nuestro laboratorio. Debido a los genes de resistencia a antibióticos presentes en el vector, las bacterias transformadas fueron capaces de generar colonias en medio Luria-Bertani (LB) sólido en presencia de 100  $\mu$ g/mL de ampicilina. Cabe destacar que el vector pCR-4Blunt-TOPO contiene el gen CCdB, letal para *E. coli* y que es el sitio de ligación del producto de PCR. De esta forma se asegura que las colonias formadas corresponden a bacterias transformadas con vectores en los cuales se ha ligado un producto de la reacción de PCR.



**Figura 9. Mapa del vector pCR4Blunt-TOPO.** Se muestra un esquema del vector con la secuencia que flanquea al sitio de clonación (recuadro negro) junto con los sitios de corte de diferentes enzimas de restricción y los sitios de alineamiento de los *primers* T3 y T7.

Después de la transformación se eligieron veinte colonias aisladas y se sembraron en medio líquido LB también con ampicilina con el fin de amplificar el plásmido de interés. Después de 16 horas de incubación con agitación, se procedió a la purificación del DNA plasmídico. Una alícuota (1-2  $\mu$ L) se digirió con la enzima *EcoR* I (cuyos sitios de corte se muestran en la Fig. 9) para liberar el fragmento insertado en el vector. Los fragmentos liberados se visualizaron en un gel de agarosa al 1% y se eligieron algunos para determinar su identidad molecular mediante secuenciación automática en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM, utilizando los *primers* T3 y T7.

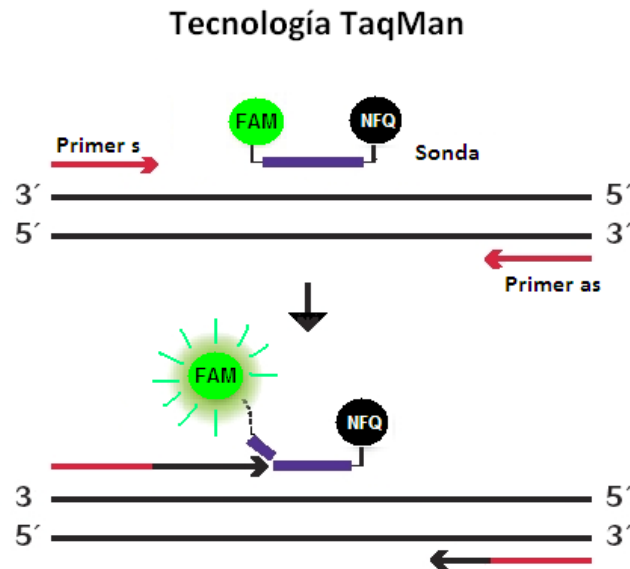
## RT-PCR en Tiempo Real

La expresión diferencial de los CSDV en biopsias de CaCu positivas para VPH-18, se realizó mediante PCR cuantitativa, mejor conocida como PCR en tiempo real (qPCR), ya que esta técnica es mucho más sensible para la detección y la cuantificación de los niveles de mRNA en una muestra

En primer lugar se llevó a cabo la síntesis de cDNA a partir de RNA total de las muestras de CaCu y las muestras control (CNC), mediante el empleo del kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). La mezcla de reacción contenía 1.5 µg de RNA, 2 µL de amortiguador 10X, 0.8 µL de 100 mM dNTPs, 2 µL de *random primers* (oligonucleótidos de secuencia aleatoria que permiten la retrotranscripción de cualquier molécula de RNA presente en la muestra), 1 µL de inhibidor de RNAsas y agua suficiente para obtener un volumen final de 20 µL. La síntesis de cDNA se llevo a cabo a 37 °C durante 120 min de acuerdo a las indicaciones del kit. Una vez sintetizado el cDNA, se agregaron 20 µL de H<sub>2</sub>O, se etiquetó como cDNA *stock* y a partir de éste se prepararon alícuotas de diluciones 1:4 que fueron almacenadas a -20 °C.

Las reacciones de qPCR se realizaron utilizando sondas TaqMan y un termociclador *ABI Prism 7000 Sequence Detection System* acoplado a una computadora que contiene el software SDS 1.2.2 para la adquisición y análisis de resultados (Applied Biosystems). Los ensayos para cada uno de los genes fueron sintetizados por la compañía referida, y cada ensayo consistió de una sonda hidrolítica complementaria a un fragmento específico de cada gen, flanqueada por un par de *primers* convencionales. La sonda tiene un compuesto fluorogénico reportero FAM (6-carboxifluoresceína) unido covalentemente al extremo 5' cuya fluorescencia es absorbida por el silenciador (*quencher*) no fluorescente NFQ, localizado en el extremo 3' de la sonda (Fig. 10), efecto denominado *fenómeno de transferencia de energía de resonancia fluorescente* (FRET). Durante la reacción de PCR, la Taq polimerasa realiza la elongación del primer y degrada la sonda, de tal suerte que el fluoróforo es liberado por hidrólisis, permitiendo así que éste emita fluorescencia al separarse del silenciador,

suprimiendo el efecto FRET. Con cada ciclo de PCR, más moléculas de FAM son liberadas dando como resultado un incremento en la intensidad de fluorescencia que es proporcional a la cantidad de DNA molde presente en la reacción.

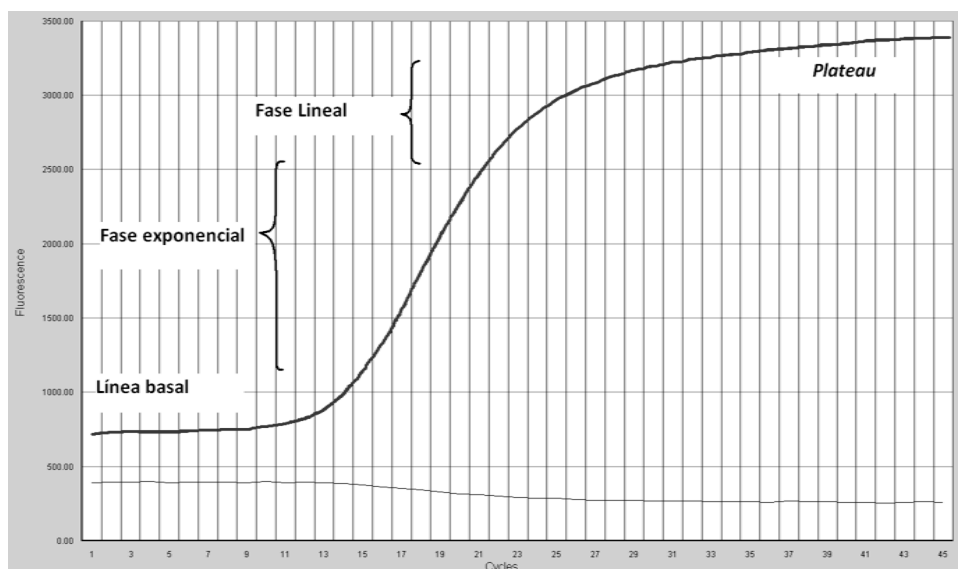


**Figura 10. Tecnología TaqMan para qPCR.** Se muestra el fundamento de la tecnología TaqMan empleada en este proyecto para llevar a cabo la RT-PCR en tiempo real. En rojo se representan los *primers* sentido (s) y antisentido (as), y en morado la sonda, que contiene un fluoróforo (FAM) y un silenciador (NFQ). Por acción de la Taq polimerasa, el fluoróforo se libera y emite fluorescencia, la cual es detectada por el aparato al finalizar cada ciclo de la reacción.

La presencia de la sonda diseñada para el gen de interés dentro de la zona flanqueada por los *primers* hace que esta reacción sea mucho más específica que la reacción de RT-PCR estándar. Por otro lado, los fragmentos que se amplifican por este método son pequeños (alrededor de 100 pares de bases), lo que también incrementa la especificidad del ensayo. Conforme transcurre la reacción, el programa de computación acoplado al detector calcula el valor específico de emisión de fluorescencia ( $\Delta R_n$ ) que está dado por la siguiente ecuación:

$$\Delta R_n = R_{n+} - R_{n-}$$

donde  $R_{n+}$  es la emisión de fluorescencia en cada punto, y  $R_{n-}$  es la emisión de fluorescencia basal. Al hacer el análisis, el programa presenta el gráfico de  $\Delta R_n$  en función del ciclo de la reacción (Fig. 11).



**Figura 11. Fases de la reacción de RT-PCR en tiempo real.** Se muestra la gráfica que presenta el programa acoplado al detector después de terminar la reacción. Se observa claramente el aumento de la señal de fluorescencia (eje de las ordenadas) en función del número de ciclos de la reacción (eje de las abscisas), y se señala cada una de las cuatro fases.

La amplificación de los DNA molde está determinada por cuatro fases: 1) línea basal; 2) fase exponencial; 3) fase lineal y 4) meseta (*plateau*). La línea basal contiene las amplificaciones en las cuales el nivel de fluorescencia emitido está por debajo del nivel de detección del instrumento. A pesar de que no hay una señal detectable, durante estos ciclos también existe amplificación. La segunda fase, la exponencial, comienza en las primeras señales que detecta el aparato y continúa durante el periodo en el cual hay una máxima eficiencia de amplificación, es decir que hay un exceso de reactivos y poca cantidad de molde y producto compitiendo por ellos, con lo cual se lleva a cabo una amplificación de tipo exponencial o geométrica. El 100% de eficiencia en esta fase se alcanza cuando se sintetizan 2 moléculas por cada molde disponible en cada ciclo de la reacción. La longitud de esta fase depende de la concentración de molde inicial y de la calidad de cada uno de los ensayos. En la fase lineal, la eficiencia de replicación

empieza a decaer posiblemente debido a que comienza a haber competencia por la unión a *primers* o que la actividad de la DNA polimerasa se ve afectada por la alta concentración de producto. También existe la posibilidad de que se generen productos que pueden resultar tóxicos para la polimerasa, o que después de varios ciclados térmicos ésta vaya perdiendo actividad. Finalmente, en la fase de *plateau*, la velocidad de amplificación cae hasta valores cercanos a cero, en donde se presenta como una etapa estacionaria donde el valor de fluorescencia emitida casi no cambia de un ciclo a otro (Fig. 11).

### **Rangos Dinámicos**

Los rangos dinámicos son una serie de experimentos de PCR en tiempo real que se realizan previos a la cuantificación como tal de los genes de interés, y que tienen como finalidad determinar la eficiencia de la reacción de PCR para cada uno de ellos y conocer el rango de concentración adecuado del molde (cDNA) que puede ser cuantificado con precisión y exactitud.

En un proyecto previo de nuestro laboratorio (Hernández Plata, 2008), se determinaron los rangos dinámicos para la detección de las subunidades sensibles a la TTX, así como para las cuatro subunidades  $\beta$ , encontrando para todos los casos que la dilución 1:4 del cDNA *stock* cumple con las características necesarias para cuantificar las diferencias en la expresión de cada gen; sin embargo, al momento de iniciar este estudio no se contaba con los rangos dinámicos para la subunidad  $Na_v1.5$ , tanto la isoforma adulta ( $Na_v1.5A$ ), como la neonatal ( $Na_v1.5N$ ), por lo que se procedió a realizarlos de la siguiente manera.

En el caso de  $Na_v1.5N$  se utilizó como molde el cDNA sintetizado a partir de 3  $\mu$ g de RNA total de la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama, en la cual se expresa abundantemente esta isoforma de  $Na_v1.5$  (Chioni *et al.*, 2010). Partiendo de la solución *stock* se hicieron diluciones seriales 1:2 hasta llegar a la dilución 1:32. De estas diluciones se utilizaron 3  $\mu$ L para cada reacción (por duplicado) en un volumen final de



15  $\mu\text{L}$ . En lo que concierne a la isoforma adulta, se utilizó como molde la clona hH1 (subunidad  $\text{Na}_v1.5$  de adulto subclonada en el vector pcDNA3; proporcionado amablemente por el Dr. Eduardo Salinas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla). La concentración inicial de la solución de plásmido fue de 200  $\text{pg}/\mu\text{L}$ , y a partir de ésta se hicieron diluciones seriales 1:10 hasta llegar a una concentración de 2  $\text{fg}/\mu\text{L}$ . De las diluciones se tomó 3  $\mu\text{L}$  para cada reacción en un volumen final de 15  $\mu\text{L}$ , y cada una se hizo por duplicado.

Al finalizar la reacción, se fijó un valor de umbral (un valor de  $\Delta R_n$  en el eje de las ordenadas) en el cual todas las muestras se encontraban en la fase exponencial, y el programa proporcionó los valores de  $C_T$  (número de ciclo en el cual se alcanza el valor de  $\Delta R_n$  del umbral establecido) de cada reacción. Con ellos se calcularon los promedios para cada dilución y se graficaron en función de la concentración de molde inicial en forma logarítmica. Posteriormente, los puntos en la gráfica se ajustaron a una línea recta por medio de una regresión lineal, y se obtuvo la ecuación que define a esa línea. La eficiencia de la reacción de qPCR se calculó con la siguiente ecuación:

$$E = 10^{(-1/s)} - 1$$

donde **S** es la pendiente de la recta ajustada a los valores de  $C_T$  (Dorak, 2006). Esto nos permite tener un indicativo de qué tan bien procede la reacción de PCR en las condiciones establecidas; idealmente el valor de eficiencia debe ser 100%.

### **Reacción de RT-PCR en Tiempo Real**

En las reacciones de qPCR se utilizaron pares de *primers* y sondas TaqMan específicas para cada uno de los genes de interés (Tabla 3). Las reacciones de qPCR fueron preparadas por triplicado para cada muestra en un volumen final de 15  $\mu\text{L}$ , con 3  $\mu\text{L}$  de la dilución 1:4 de cDNA *stock*, 0.6  $\mu\text{L}$  de ensayo (*primers* y sonda), 7.5  $\mu\text{L}$  de *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems) y 3.9  $\mu\text{L}$  de agua. Para

corroborar la ausencia de contaminación en las reacciones, se incluyó un control negativo sin DNA molde en el cual no se esperaba amplificación alguna.

**Tabla 3. Características de los ensayos TaqMan empleados en las reacciones de qPCR.**

mRNA	No. acceso en el GenBank	Secuencia de los primers (5' → 3')	Tamaño del cDNA(pb)	Eficiencia %
Nav1.1	AF225985	F:GAGCAATGAGTATAGCCAGCATTCTA R: ACCAACAGGGTGGGCATTT P: TGAAGAATCCAGGCAG	81	95
Nav1.2	NM_021007	F: TGGTCATTTTCTTGGGCTCATTCT R: GGCCTGATTCTGTTCTCATAGG P: TGATCTTGGCTGTGG	83	85
Nav1.3	NM_006922	F: AGACGCAATAGCAAAACAAGCATT R: CAGCAAAGTCATTTTTCAGATCCAACA P: CAGTTTCAGAGGTCGG	76	92
Nav1.4	NM_000334	F: CCCTGCTCTGTGGGAACA R:CCCGGTCTTGATGCACTCATAAC P: GTGATGCTGGGCACTG	68	100
Nav1.5N	AJ310886	F: TGTGATTATCATGGCGTATGTATCAGAAA R: TTAGAGCTCTCAGGACTCTGAAAGT P: CAATTTGTGCGGCTCTT	86	100
Nav1.5A	NM_198056	F: GTGGACCTGGGCAATGTCT R: GGCCCGGAGGACTCG P: CAGCCTTACGCACCTTC	51	103
Nav1.6	AY682081	F: GGGATCCATGGAAGTGGTTAGATTT R: GCTCGGAGAACCCTGAATGTT P: AGTTTGTGGACCTGGG	109	92
Nav1.7a	NM_002977	F: GCAATGTTTCAGCTCTTCGAACTT R: CTTCAGGCCTGGGATTACAGAAATA P: GAGTATTGAGAGCTTTGAAAA	74	91
Nav1.7b	N/A	F: GGGCAATGTCTCAGCGTTGA R: CGATGGTCTTTAGTCCTGGAATGAC P: GAGTTCTCCGAGCAT	83	92
Navβ1	NM_001037	F: GGAGGATGAGCGCTTCGA R: CAGATCCTGCAGGTCTTTGGT P: AATGGCAGCCGGGG	70	97
Navβ2	NM_004588	F: TGCAGCCGGAGGATGAG R: GAGGACCTGCAGATGGATCTTG P: CCCCTGACCGCCACCG	92	100
Navβ3	NM_018400	F: CGCCAGCCCCAGAAGAT R: CACAGGGAAGCAGACACTGA P: TTTCCCCTGGCTTCTC	90	96
Navβ4	NM_174934	F: AAGAAGTGGACAACACAGTGACA R: TGAGTTTCTTGATCAGCAGGATGAG P: CTGTCGTGGGCGGGGT	93	100

Se presenta la misma información como en la Tabla 1, y se adiciona la secuencia de la sonda Taqman (P) y el porcentaje de eficiencia de la amplificación de cada mRNA. N/A: para el diseño de este ensayo se utilizó la secuencia reportada por Hernández Plata., 2008.

Las reacciones fueron distribuidas en placas de 96 pozos y cubiertas con tapas plásticas adhesivas (Applied Biosystems), y se les sometió a un ciclado térmico que consistió de un primer paso de 2 min a 50 °C (activación enzimática), seguido de 10 min a 95 °C (desnaturalización del cDNA), y finalmente de un paso de 45 ciclos consistentes a su vez de dos fases: 15 s a 95 °C (desnaturalización del cDNA), y 1 min a 60 °C (que incluye el alineamiento y elongación).

### **Determinación de la Abundancia Relativa del Mensajero de Cada Gen**

Una vez finalizada la reacción de PCR se fijó un mismo umbral para todas las muestras en la fase geométrica en la cual existe un 100% de eficiencia de la reacción, y se obtuvo el valor de  $C_T$  promedio de la misma manera que se explicó en la sección de Rangos Dinámicos. El análisis de la abundancia relativa del mensajero de cada gen entre las distintas muestras se determinó mediante el método de  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Livak & Schmittgen, 2001), utilizando los valores de expresión de  $Na_v\beta 1$  como gen normalizador (aunque este no es un gen constitutivo, fue el que presentó la menor variación entre muestras CNC y CaCu, ver Fig. 20). Este método de cuantificación relativa permite calcular el cambio en la expresión de un gen respecto a una muestra control y normalizado con una referencia endógena. El análisis no requiere de la elaboración de curvas de calibración con cantidades de molde conocidas, y las unidades en las cuales se reporta la expresión relativa son arbitrarias.

Los valores de  $C_T$  de las muestras problema y de las muestras control se normalizan con los valores de  $C_T$  de un gen constitutivo endógeno propiamente seleccionado para el estudio que se va a realizar. Este gen endógeno debe tener el mismo grado de expresión en ambos grupos de muestras, y debe expresarse en cantidades suficientes. Su función es normalizar la cantidad de cDNA añadido en cada reacción de qPCR. Algunos genes constitutivos que se usan con frecuencia son  $\beta$ -actina, HPRT1, GAPDH,  $\beta_2$  microglobulina, entre otros (Livak & Schmittgen, 2001; Valente *et al.*, 2009). La elección de las muestras control depende del tipo de experimento que se pretende realizar. En nuestro caso se utilizó como control un grupo de muestras de cérvix no

canceroso. De esta forma, los datos obtenidos por este método representan el cambio en la expresión de los CSDV en CaCu positivo para VPH-18 normalizado a una referencia endógena ( $Na_v\beta 1$ ) y relativo a la expresión de estos canales en biopsias de cérvix no canceroso. Para calcular el cambio en la expresión relativa se utiliza la siguiente ecuación:

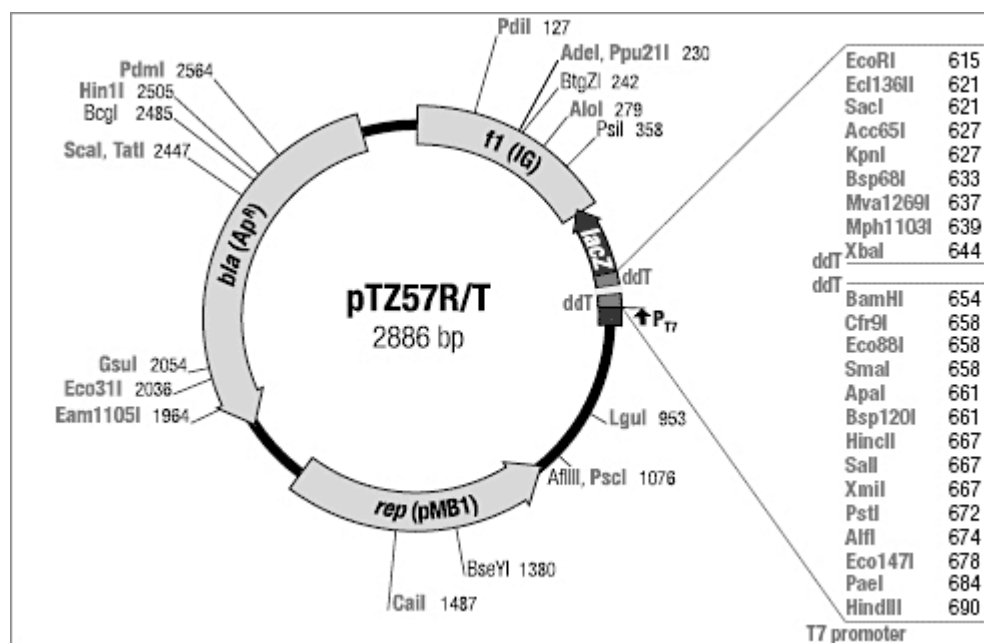
$$\text{Cambio en la expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

donde  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ problema} - \Delta C_T \text{ control}$ , y  $\Delta C_T \text{ problema} = C_T \text{ problema} - C_T \text{ gen endógeno}$ , así como  $\Delta C_T \text{ control} = C_T \text{ control} - C_T \text{ gen endógeno}$ . Para las muestras control, el  $\Delta\Delta C_T$  equivale a cero, y por lo tanto  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  en estos casos es 1, por lo que el análisis de  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  en las muestras problema indica el número de veces de expresión del gen de interés con respecto a las muestras control. Los valores menores a 1 indican subexpresión, y los valores mayores a 1 representan una sobreexpresión.

### **Caracterización de las Isoformas de $Na_v1.5$**

Los fragmentos  $Na_v1.5A$  y  $Na_v1.5N$  amplificados por qPCR fueron clonados para ser secuenciados y corroborar su identidad molecular. En este caso se utilizó el vector pTZ57R/T del kit *InsTAclone™ PCR Cloning Kit* (Fermentas-Thermo Fisher Scientific), cuyo mapa se muestra en la Fig. 12. Para lograr tal cometido, primero se purificaron los productos de reacción de la qPCR de la subunidad  $Na_v1.5A$  y  $Na_v1.5N$  (ambas muestras de CaCu), por medio del kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, WI), utilizando para cada caso los tres triplicados (45  $\mu$ L totales). El DNA purificado se eluyó con 30  $\mu$ L de agua. Posteriormente, la ligación del producto de qPCR con el vector, se llevó a cabo con 2.5-5  $\mu$ L de los purificados. La reacción de ligación se utilizó para transformar bacterias *E. coli* calcio competentes. Las bacterias transformadas fueron capaces de crecer en medio LB sólido en presencia de 100  $\mu$ g/mL de ampicilina, de donde se eligieron 8 colonias aisladas para cada una de las isoformas de interés, y se sembraron en medio líquido LB adicionado también con ampicilina. Después de 15 horas de incubación a 37 °C con agitación, se purificó el plásmido y se tomó una alícuota para someterla a digestión con las enzimas *EcoR I* y

HindIII para liberar el inserto. Finalmente, la digestión se corrió en un gel de agarosa al 2% para seleccionar las clonas positivas con base en el tamaño del fragmento liberado. Posteriormente se secuenciaron de manera automática en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, utilizando el *primer* comercial M13. Las secuencias obtenidas fueron analizadas por medio de un BLAST para determinar el porcentaje de identidad con las secuencias de mRNA reportadas en el *GenBank*.



**Figura 12. Vector pTZ57R/T.** Se muestra el mapa del vector con los sitios de corte de diferentes enzimas de restricción y el sitio de ligación del producto de PCR de interés. El vector contiene un gen de resistencia a ampicilina y el gen *LacZ* dentro del cual se encuentra el sitio de ligación del producto de PCR, especialmente diseñado para fragmentos con una adenina no apareada en el extremo 3'.

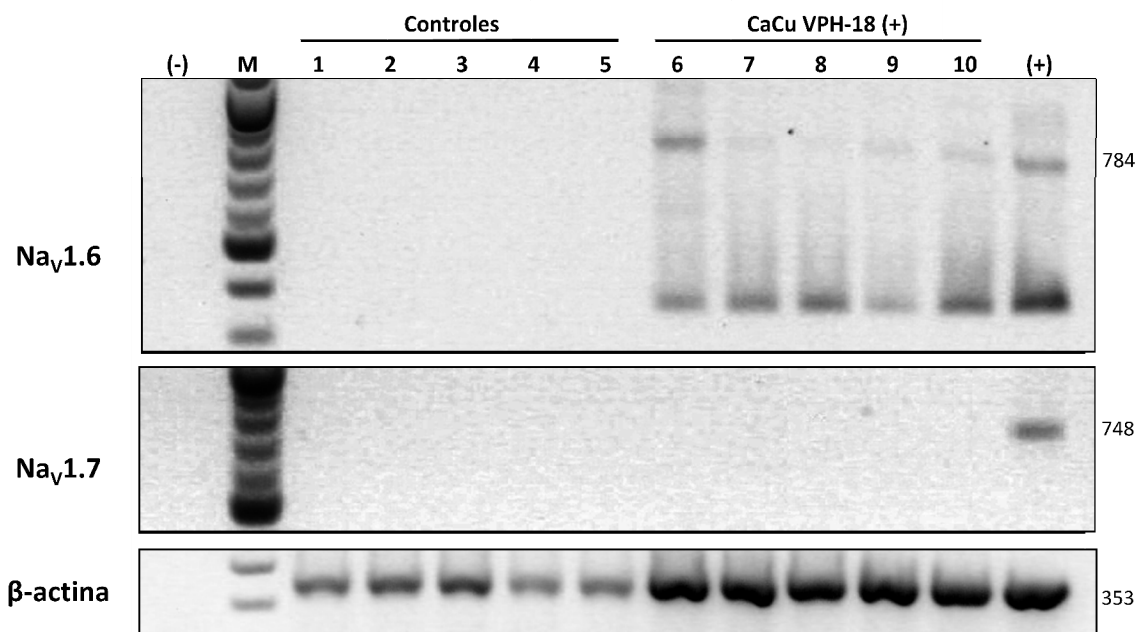
## RESULTADOS

### Identificación de las Subunidades $Na_v1.6$ y $Na_v1.7$ por RT-PCR Estándar

El primer abordaje para investigar la expresión de subunidades de canales  $Na_v$  en biopsias de CaCu positivas a VPH-18 consistió en la amplificación de las subunidades  $Na_v1.6$  y  $Na_v1.7$ , así como del gen endógeno  $\beta$ -actina por medio de RT-PCR estándar en 5 muestras de cérvix no canceroso (CNC) y 5 muestras de CaCu positivas para VPH-18. Los resultados de estas reacciones de PCR se muestran en la Fig. 13. En ella se puede observar que con esta técnica no se detectó expresión alguna del mensajero de  $Na_v1.7$  en ninguna de las muestras estudiadas de CNC y CaCu. Únicamente en el control positivo (cultivo primario JP) se puede observar la banda esperada de 748 pares de bases para esta subunidad. Por el contrario, el amplicón esperado de 784 pb que concierne a la subunidad  $Na_v1.6$  se observó en las 5 biopsias de CaCu, así como en el control positivo (línea celular IMR32). Interesantemente, en las muestras de CNC no se observó ninguna amplificación aparente. Por otro lado, en la parte baja de la Fig. 13, también se aprecia claramente un aumento en la expresión de  $\beta$ -actina en los casos de cáncer, en comparación con el tejido no canceroso. Esta aseveración se hace con base en la intensidad de las bandas que se muestran en dicha figura, no se debe perder de vista que la técnica de PCR estándar no es cuantitativa. No obstante, resultados anteriores de nuestro grupo de investigación han mostrado con qPCR que en efecto,  $\beta$ -actina se sobreexpresa más de 1000 veces en el CaCu (VPH-16) respecto a CNC (Hernández Plata, 2008). Es por ello, que aunque sea un gen constitutivo,  $\beta$ -actina no puede ser utilizado como gen normalizador cuando se comparan muestras de CaCu y CNC.

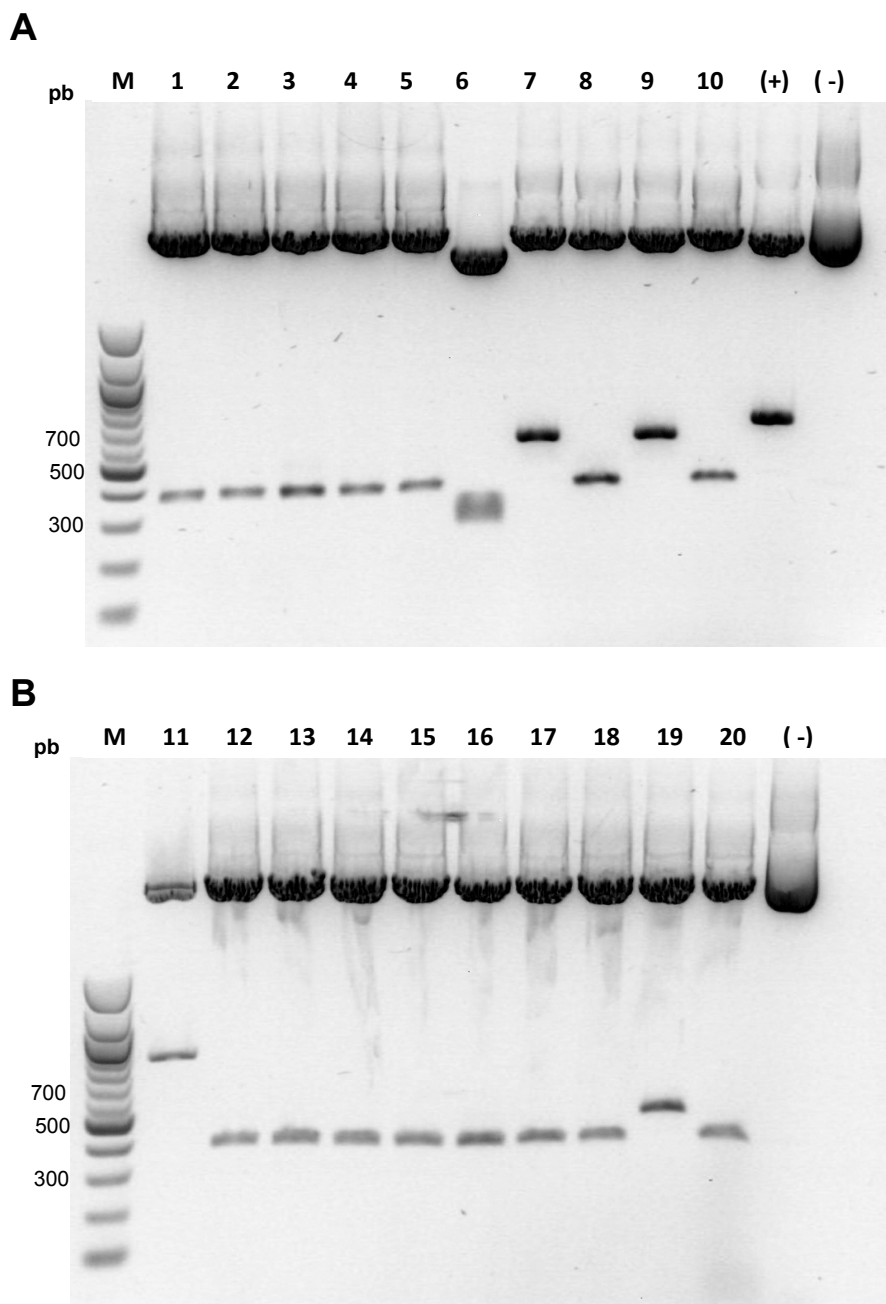
Por otra parte, es justo hacer notar que además del amplicón esperado, se amplificaron otras bandas de menor tamaño molecular en las reacciones de PCR de  $Na_v1.6$  (Fig. 13, panel superior). Para esclarecer la identidad molecular de las bandas no esperadas que se obtuvieron con la amplificación de  $Na_v1.6$ , se utilizó una alícuota (5  $\mu$ L) de una de las reacciones de RT-PCR para ligar dichas bandas en el vector pCR-4Blunt-TOPO y propagarlo en bacterias de *E. coli*. Después de su purificación, el vector fue sometido

a digestión con la enzima *EcoR1* para liberar los fragmentos ligados. Los productos de estas digestiones fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1% (Fig. 14), de los cuales se seleccionaron cuatro de diferente tamaño para ser secuenciados.



**Figura 13. Expresión diferencial del mRNA de  $Na_v1.6$  y  $Na_v1.7$  en biopsias de CaCu positivas para VPH-18 y de CNC por RT-PCR estándar.** Resultados de reacciones de RT-PCR en las que se utilizaron *primers* específicos para los genes indicados a la izquierda. Cada mezcla de reacción incluyó 150 ng de RNA total. Después de 40 ciclos de amplificación, los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. De cada gel se obtuvo una fotografía digital, misma que se muestra en su forma negativa. Carriles en cada panel: (-), sin RNA en la reacción; M, marcador de tamaño molecular en incrementos de 100 pb; 1-5, biopsias de CNC; 6-10, biopsias de CaCu positivas para VPH-18; (+), controles positivos: RNA de células IMR32 y JP para  $Na_v1.6$  y  $Na_v1.7$ , respectivamente. Los números a la derecha indican el número de pares de bases esperado para cada amplicón.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas haciendo un BLAST en el cual se encontró que todas ellas están relacionadas con la secuencia de nucleótidos reportada para la subunidad  $Na_v1.6$  (códigos de acceso en el *GenBank*: AK309213 y AY682081). Debido a la similitud en el arreglo de exones e intrones, así como en la secuencia de aminoácidos en los que varían las isoformas neonatal y adulta de los genes *SCN2A* y *SCN3A* (subunidades  $Na_v1.2$  y  $Na_v1.3$  respectivamente), se ha clasificado a dicha secuencia de  $Na_v1.6$  como la isoforma de adulto (Plummer *et al.*, 1998).



**Figura 14. Separación de los productos de PCR de  $Na_v1.6$  clonados en el vector pCR-4Blunt-TOPO.** Se muestran los productos de la digestión con *EcoRI* del DNA plasmídico de 20 colonias diferentes (10 en **A** y 10 en **B**) de *E. coli* transformadas con el vector. (+), control positivo de digestión que consiste del mismo vector con un fragmento clonado de  $Na_v1.1$ . (-), DNA plasmídico sin digerir. Las clonas 9, 11, 16 y 19 fueron seleccionadas para secuenciación.

Curiosamente los resultados del BLAST indican un 100% de identidad de la secuencia de las cuatro clonas con la de AK309213 y AY682081, esto es porque el algoritmo de



BLAST alinea los fragmentos de la secuencia donde hay mayor identidad, sin considerar que el resto de la secuencia difiera en un alto porcentaje por presentar vacíos (*gaps*). Por ejemplo, la clona 9 presenta 100% de identidad con dichas secuencias pero solo considerando 415 (de un total de 575) nucleótidos para dicho alineamiento (Tabla 4). Únicamente el inserto de la clona 11 corresponde al tamaño esperado de acuerdo a los *primers* utilizados para la reacción de RT-PCR y acertadamente presenta un 100% de identidad con la subunidad Na<sub>v</sub>1.6 de adulto.

**Tabla 4. Identidad de los productos amplificados por RT-PCR estándar para Na<sub>v</sub>1.6.**

Clona	Tamaño de inserto (pb)	Gen con mayor % de identidad	No. Acceso en el <i>GenBank</i>	% Identidad	QL
9	575	SCN8A (Na <sub>v</sub> 1.6A)	AK309213 y AY682081	100%	415
<b>11</b>	<b>784</b>	<b>SCN8A (Na<sub>v</sub>1.6A)</b>	AK309213 y AY682081	<b>100%</b>	<b>784</b>
16	354	SCN8A (Na <sub>v</sub> 1.6A)	AK309213 y AY682081	100%	193
19	483	SCN8A (Na <sub>v</sub> 1.6A)	AK309213 y AY682081	100%	193

Para cada clona se presenta el tamaño de cada inserto en pares de bases, el nombre del gen y la subunidad para la que codifica, el número de acceso en el *GenBank*, el correspondiente porcentaje de identidad obtenido del BLAST y el número de nucleótidos considerados por el algoritmo de BLAST para proporcionar el porcentaje de identidad.

Con el propósito de visualizar mejor las diferencias de las cuatro clonas investigadas con la secuencia AY682081 de Na<sub>v</sub>1.6 adulto, se realizó un alineamiento utilizando el programa DNAsis MAX y los resultados se presentan en la Fig. 15. En ella se pueden apreciar claramente los *gaps* que existen en las clonas 9, 19 y 16, lo que las hace ser más cortas, aunque en la secuencia existente presenten un 100% de identidad con AY682081.

La traducción a proteína de las 4 secuencias obtenidas indicó que los fragmentos de las clonas 9, 16 y 19 contienen codones de paro en todos sus marcos de lectura, por lo que probablemente se trata de RNAs “basura” (no codifican para proteínas funcionales). Únicamente la secuencia de aminoácidos de la clona 11 carece de codones de paro en uno de sus marcos de lectura, y al alinearlos con la proteína del canal Na<sub>v</sub>1.6 encontramos que comparten un 100% de identidad en su secuencia de aminoácidos (Fig. 16).

Nav1.6-AY682081	141	TGCTGAGAGC	AAGCTCAAGA	AACCACCAA	GGCCGATGGC	AGTCATCGGG	AGGACGATGA	GGACAGCAAG	210
Clona 11	1	-----	-----	-----	A GGCCGATGGC	AGTCATCGGG	AGGACGATGA	GGACAGCAAG	41
Clona 9	1	-----	-----	-----	A GGCCGATGGC	AGTCATCGGG	AGGACGATGA	GGACAGCAAG	41
Clona 19	1	-----	-----	-----	A GGCCGATGGC	AGTCATCGGG	AGGACGATGA	GGACAGCAAG	41
Clona 16	1	-----	-----	-----	A GGCCGATGGC	AGTCATCGGG	AGGACGATGA	GGACAGCAAG	41
Nav1.6-AY682081	211	CCCAAGCCAA	ACAGCGACCT	GGAAAGCAGGG	AAGAGTTTGC	CTTTTCATCTA	CGGGGACATC	CCCCAAGGCC	280
Clona 11	42	CCCAAGCCAA	ACAGCGACCT	GGAAAGCAGGG	AAGAGTTTGC	CTTTTCATCTA	CGGGGACATC	CCCCAAGGCC	111
Clona 9	42	CCCAAGCCAA	ACAGCGACCT	GGAAAGCAGGG	AAGAGTTTGC	CTTTTCATCTA	CGGGGACATC	CCCCAAGGCC	111
Clona 19	42	CCCAAGCCAA	ACAGCGACCT	GGAAAGCAGGG	AAGAGTTTGC	CTTTTCATCTA	CGGGGACATC	CCCCAAGGCC	111
Clona 16	42	CCCAAGCCAA	ACAGCGACCT	GGAAAGCAGGG	AAGAGTTTGC	CTTTTCATCTA	CGGGGACATC	CCCCAAGGCC	111
Nav1.6-AY682081	281	TGGTTGCAGT	TCCCTTGGAG	GACTTTGACC	CATACTATTT	GACGCAGAAA	ACCTTTGTAG	TATTAACAG	350
Clona 11	112	TGGTTGCAGT	TCCCTTGGAG	GACTTTGACC	CATACTATTT	GACGCAGAAA	ACCTTTGTAG	TATTAACAG	181
Clona 9	112	TGGTTGCAGT	TCCCTTGGAG	GACTTTGACC	CATACTATTT	GACGCAGAAA	ACCTTTGTAG	TATTAACAG	161
Clona 19	112	TGGTTGCAGT	TCCCTTGGAG	GACTTTGACC	CATACTATTT	GACGCAGAAA	ACCTTTGTAG	TATTAACAG	161
Clona 16	112	TGGTTGCAGT	TCCCTTGGAG	GACTTTGACC	CATACTATTT	GACGCAGAAA	ACCTTTGTAG	TATTAACAG	161
Nav1.6-AY682081	351	AGGGA AAACT	CTCTTCAGAT	TTAGTGCCAC	GCCTGCCTTG	TACATTTTAA	GTCCTTTTAA	CCTGATAAGA	420
Clona 11	182	AGGGA AAACT	CTCTTCAGAT	TTAGTGCCAC	GCCTGCCTTG	TACATTTTAA	GTCCTTTTAA	CCTGATAAGA	251
Clona 9	161	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	161
Clona 19	161	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	161
Clona 16	161	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	161
Nav1.6-AY682081	421	AGAATAGCTA	TAAAAATTTT	GATACATTCA	GTATTTAGCA	TGATCATTAT	GTGCACTATT	TTGACCAACT	490
Clona 11	252	AGAATAGCTA	TAAAAATTTT	GATACATTCA	GTATTTAGCA	TGATCATTAT	GTGCACTATT	TTGACCAACT	321
Clona 9	161	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	161
Clona 19	161	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	161
Clona 16	161	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	161
Nav1.6-AY682081	491	GTGTATTCAT	GACTTTTAGT	AACCCCTCTG	ACTGGTCGAA	GAATGTGGAG	TTC CGTTC	CGGG TTT	560
Clona 11	322	GTGTATTCAT	GACTTTTAGT	AACCCCTCTG	ACTGGTCGAA	GAATGTGGAG	TTC CGTTC	CGGG TTT	391
Clona 9	162	-----	-----	-----	-----	-----	TTC CGTTC	CGGG TTT	182
Clona 19	162	-----	-----	-----	-----	-----	TTC CGTTC	CGGG TTT	182
Clona 16	161	-----	-----	-----	-----	-----	TTC CGTTC	CGGG TTT	161
Nav1.6-AY682081	561	TTC TTTG	TTC CTG TG	TTC TTTG	TTC GGTTTC	TTC T G TG	TTC TTT CCTT	TTT CGGG T	630
Clona 11	392	TTC TTTG	TTC CTG TG	TTC TTTG	TTC GGTTTC	TTC T G TG	TTC TTT CCTT	TTT CGGG T	461
Clona 9	183	TTC TTTG	TTC CTG TG	TTC TTTG	TTC GGTTTC	TTC T G TG	TTC TTT CCTT	TTT CGGG T	252
Clona 19	183	TTC TTTG	TTC CTG TG	TTC TTTG	TTC GGTTTC	TTC T G TG	TTC TTT CCTT	TTT CGGG T	252
Clona 16	161	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	161
Nav1.6-AY682081	631	CT TGG CT	GGTT G TTT	CTGTGCTC	TG TGGC T	TGTG C G	GTTTGTGG C	CTGGC T G	700
Clona 11	462	CT TGG CT	GGTT G TTT	CTGTGCTC	TG TGGC T	TGTG C G	GTTTGTGG C	CTGGC T G	531
Clona 9	253	CT TGG CT	GGTT G TTT	CTGTGCTC	TG TGGC T	TGTG C G	GTTTGTGG C	CTGGC T G	322
Clona 19	253	CT TGG CT	GGTT G TTT	CTGTGCTC	TG TGGC T	TGTG C G	GTTTGTGG C	CTGGC T G	290
Clona 16	161	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	161
Nav1.6-AY682081	701	TCTCGCGCT	G G C T TC	GGGTTCTCC	G GCTTTG	ACTTCTCT	GT TTTCC G	GCCTGAAGAC	770
Clona 11	532	TCTCGCGCT	G G C T TC	GGGTTCTCC	G GCTTTG	ACTTCTCT	GT TTTCC G	GCCTGAAGAC	601
Clona 9	323	TCTCGCGCT	G G C T TC	GGGTTCTCC	G GCTTTG	ACTTCTCT	GT TTTCC G	GCCTGAAGAC	392
Clona 19	291	-----	-----	-----	-----	-----	-----	GCCTGAAGAC	300
Clona 16	162	-----	-----	-----	-----	-----	-----	GCCTGAAGAC	171
Nav1.6-AY682081	771	AATTGTGGGT	GCCCTGATTC	AGTCTGTGAA	GAAACTGTCA	GATGTGATGA	TCCTGACAGT	GTCTGCCTG	840
Clona 11	602	AATTGTGGGT	GCCCTGATTC	AGTCTGTGAA	GAAACTGTCA	GATGTGATGA	TCCTGACAGT	GTCTGCCTG	671
Clona 9	393	AATTGTGGGT	GCCCTGATTC	AGTCTGTGAA	GAAACTGTCA	GATGTGATGA	TCCTGACAGT	GTCTGCCTG	462
Clona 19	301	AATTGTGGGT	GCCCTGATTC	AGTCTGTGAA	GAAACTGTCA	GATGTGATGA	TCCTGACAGT	GTCTGCCTG	370
Clona 16	172	AATTGTGGGT	GCCCTGATTC	AGTCTGTGAA	GAAACTGTCA	GATGTGATGA	TCCTGACAGT	GTCTGCCTG	241
Nav1.6-AY682081	841	AGTGTTTTTG	CCTTGATCGG	ACTGCAGCTG	TTCATG66GA	ACCTTCGAAA	CAAGTGTGTT	GTGTGGCCCA	910
Clona 11	672	AGTGTTTTTG	CCTTGATCGG	ACTGCAGCTG	TTCATG66GA	ACCTTCGAAA	CAAGTGTGTT	GTGTGGCCCA	741
Clona 9	463	AGTGTTTTTG	CCTTGATCGG	ACTGCAGCTG	TTCATG66GA	ACCTTCGAAA	CAAGTGTGTT	GTGTGGCCCA	532
Clona 19	371	AGTGTTTTTG	CCTTGATCGG	ACTGCAGCTG	TTCATG66GA	ACCTTCGAAA	CAAGTGTGTT	GTGTGGCCCA	440
Clona 16	242	AGTGTTTTTG	CCTTGATCGG	ACTGCAGCTG	TTCATG66GA	ACCTTCGAAA	CAAGTGTGTT	GTGTGGCCCA	311
Nav1.6-AY682081	911	TAAACTTCAA	CGAGAGCTAT	CTTGA AAAATG	GCACCAAAGG	CTT TGATTGG	GAAGAGTATA	TCAACAATAA	980
Clona 11	742	TAAACTTCAA	CGAGAGCTAT	CTTGA AAAATG	GCACCAAAGG	CTT	-----	-----	784
Clona 9	533	TAAACTTCAA	CGAGAGCTAT	CTTGA AAAATG	GCACCAAAGG	CTT	-----	-----	575
Clona 19	441	TAAACTTCAA	CGAGAGCTAT	CTTGA AAAATG	GCACCAAAGG	CTT	-----	-----	483
Clona 16	312	TAAACTTCAA	CGAGAGCTAT	CTTGA AAAATG	GCACCAAAGG	CTT	-----	-----	354

**Figura 15. Alineamiento de las secuencias de los amplicones de Nav1.6 por RT-PCR.** Las cuatro secuencias de las clonas investigadas se alinearon con la secuencia de Nav1.6 indicada (correspondiente a la subunidad Nav1.6 de adulto). El amarillo indica un 100% de similitud entre todas las secuencias alineadas y el verde la similitud en al menos 3 secuencias. Nótese que a excepción de la clona 11, las otras tres son secuencias más cortas, lo que se refleja en *gaps* en el alineamiento.

	1				50
AY682081-aa	MAARLLAPPG	PDSFKPFTPE	SLANIERRIA	ESKLLKPPKA	DGSHREDD*ED
Clona 11-aa	.....	.....	.....	.....	A DGSHREDD*ED
Clona 9-aa	.....	.....	.....	.....	A DGSHREDD*ED
Clona 19-aa	.....	.....	.....	.....	A DGSHREDD*ED
Clona 16-aa	.....	.....	.....	.....	A DGSHREDD*ED
	51			1▼2	100
AY682081-aa	SKPKNSDLE	AGKSLPFIYG	DIPQGLVAVP	LEDFDPYYLT	QKTFVVLN*RG
Clona 11-aa	SKPKNSDLE	AGKSLPFIYG	DIPQGLVAVP	LEDFDPYYLT	QKTFVVLN*RG
Clona 9-aa	SKPKNSDLE	AGKSLPFIYG	DIPQGLVAVP	LEDFDPYYLT	QK*VHVHRDL
Clona 19-aa	SKPKNSDLE	AGKSLPFIYG	DIPQGLVAVP	LEDFDPYYLT	QK*VHVHRDL
Clona 16-aa	SKPKNSDLE	AGKSLPFIYG	DIPQGLVAVP	LEDFDPYYLT	QKA*VHVHRDL
	101		2▼3		150
AY682081-aa	KTLFRFSATP	ALYILSPFNL	IRRIAIKILI	HSVFSMIIMC	TILTNCVFMT
Clona 11-aa	KTLFRFSATP	ALYILSPFNL	IRRIAIKILI	HSVFSMIIMC	TILTNCVFMT
Clona 9-aa	YIITSENHCK	RFLHRWLYLF	TGSMELVRFQ	CHHDGICDRV	CGPGQCLSAE
Clona 19-aa	YIITSENHCK	RFLHRWLYLF	TGSMELVRFQ	CHHDGARQLW	VFSLRNCQM
Clona 16-aa	FSLRNCQMSQ	CSAVFLPDC	SCSWGTFETS	VLCGPTSTRA	ILKMAPKA..
	151	3▼4			200
AY682081-aa	FSNPPDWSKN	VEYTFGTGIYT	FESLVKIIAR	GFCIDGFTFL	RDPWNWLD*FS
Clona 11-aa	FSNPPDWSKN	VEYTFGTGIYT	FESLVKIIAR	GFCIDGFTFL	RDPWNWLD*FS
Clona 9-aa	NIQGSFSPFEN	YLCNSRPEDN	CGCPDSVCEE	TVRCDDPDSV	LPECFC*LDRT
Clona 19-aa	SQCSAVFLPS	DCSCSWGTFE	TSVLCGPTST	RAILKMAPKA.	.....
Clona 16-aa	.....	.....	.....	.....	.....
	201	▼5A		5A▼6	250
AY682081-aa	VIMMAYTEF	VDLGNVSALR	TFRVLRALKT	ISVIPGLKTI	VGALIQSVK*K
Clona 11-aa	VIMMAYTEF	VDLGNVSALR	TFRVLRALKT	ISVIPGLKTI	VGALIQSVK*K
Clona 9-aa	AAVHGEP*SKQ	VCCVAHKLQR	ELSKWHQRL.	.....	.....
Clona 19-aa	.....	.....	.....	.....	.....
Clona 16-aa	.....	.....	.....	.....	.....
	251				300
AY682081-aa	LSDVMILTVF	CLSVFALIGL	QLFMGNLRNK	CVVWPIFN*E	SYLENGTK*GF
Clona 11-aa	LSDVMILTVF	CLSVFALIGL	QLFMGNLRNK	CVVWPIFN*E	SYLENGTK*GF
Clona 9-aa	.....	.....	.....	.....	.....
Clona 19-aa	.....	.....	.....	.....	.....
Clona 16-aa	.....	.....	.....	.....	.....

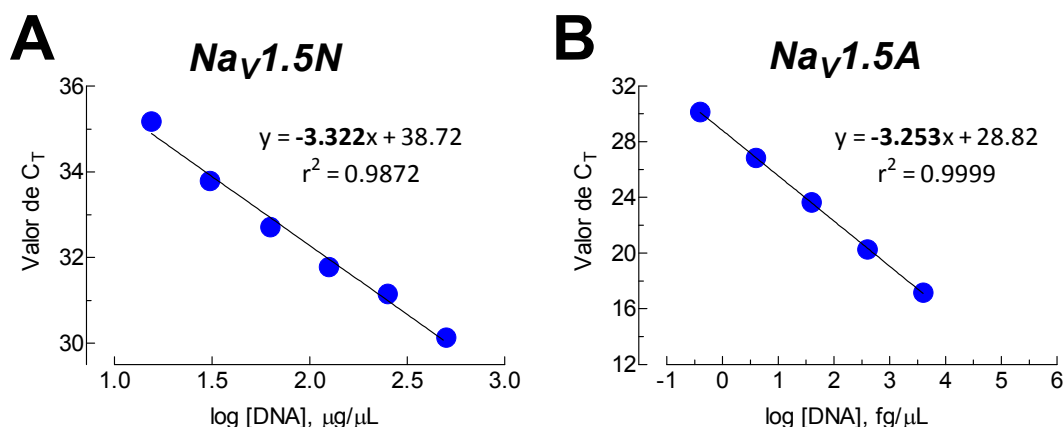
**Figura 16. Secuencia de aminoácidos de los cuatro amplicones de Na<sub>v</sub>1.6 obtenidos por RT-PCR.** Se presenta el alineamiento con la secuencia reportada para Na<sub>v</sub>1.6 de adulto (AY682081). La secuencia de la clona 11 es 100% idéntica a esta última, y de los 260 aminoácidos incluidos en el marco de lectura, solo V169 y D174 en el exón 5A (indicados en verde), son diferentes respecto a la secuencia de Na<sub>v</sub>1.6 neonatal (NM\_001177984). Las otras tres clonas presentan codones de paro (asteriscos en rojo), justo donde termina el exón 1 del gen SCN8A, por lo que dichos fragmentos amplificados no codifican para proteínas funcionales. El color amarillo indica 100% de identidad entre todas las secuencias alineadas, mientras que el azul indica 100% de identidad entre la clona 11 y AY682081. Los números al inicio y al final de cada fila de alineamiento indican el número de residuo en la secuencia de AY682081; los internos el número de exón y los ▼, los bordes de los exones.

Los resultados de esta sección indican que la subunidad Na<sub>v</sub>1.6 (isoforma de adulto) se encuentra expresada diferencialmente entre biopsias de CaCu y CNC, mientras que la subunidad Na<sub>v</sub>1.7 no puede ser detectada con la técnica de PCR estándar. Por ello,

con el propósito de cuantificar directamente los niveles de mRNA de éstas y el resto de las subunidades de los canales  $\text{Na}_V$  con la menor cantidad de muestra (RNA total) posible, se procedió a utilizar la técnica de PCR en tiempo real.

### Determinación de los Rangos Dinámicos para las Isoformas de $\text{Na}_V1.5$

Debido a que la isoforma  $\text{Na}_V1.5N$  se expresa abundantemente en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 (Chioni *et al.*, 2010), el cDNA obtenido a partir del RNA de estas células se utilizó como molde (a diferentes concentraciones) para la cuantificación del mensajero de la subunidad  $\text{Na}_V1.5N$ . Para el caso de la isoforma  $\text{Na}_V1.5A$  se utilizaron diluciones seriales del DNA de la clona hH1. Los valores de  $C_T$  obtenidos para cada una de las concentraciones (diluciones) utilizadas se graficaron *versus* el logaritmo de la concentración de cDNA contenido en cada reacción para cada uno de los ensayos (Fig. 17).



**Figura 17. Curvas estándar de qPCR para las isoformas neonatal y adulto de  $\text{Na}_V1.5N$ .** Se grafican los valores de  $C_T$  en función del logaritmo de la concentración inicial de cDNA para cada muestra. Los datos experimentales (en azul) se ajustaron con una función lineal (línea negra), cuya ecuación se muestra en la misma figura, resaltando en negritas el valor de la pendiente. Una curva estándar confiable es aquella cuyo valor de  $r^2$  debe ser muy cercano a 0.99 (Livak & Schmittgen, 2001), por lo que ambas cumplen con dicho criterio.

El valor de la pendiente, obtenida mediante el ajuste de los datos experimentales con una función lineal, se utilizó para calcular la eficiencia de la reacción para cada ensayo (Tabla 5). Los valores de eficiencia fueron 100 y 103% para  $\text{Na}_V1.5N$  y  $\text{Na}_V1.5A$ , respectivamente.

**Tabla 5. Eficiencia de las reacciones de qPCR para las isoformas de Na<sub>v</sub>1.5.**

Dilución	[cDNA] (pg/μL)	Log [cDNA]	C <sub>T</sub>	Pendiente	Eficiencia (%) ( $E = 10^{(\frac{-1}{S})} - 1$ )
<b>Na<sub>v</sub>1.5 Neonatal</b>					
1:1	500	2.70	30.13	-3.322	99.9
1:2	250	2.40	31.15		
1:4	125	2.10	31.78		
1:8	62.5	1.80	32.71		
1:16	31.25	1.49	33.785		
1:32	15.625	1.19	35.175		
<b>Na<sub>v</sub>1.5 Adulto</b>					
1:10	4	3.602	17.165	-3.253	102.96
1:100	0.4	2.602	20.255		
1:1000	0.04	1.602	23.635		
1:10000	0.004	0.602	26.845		
1:100000	0.0004	-0.398	30.135		

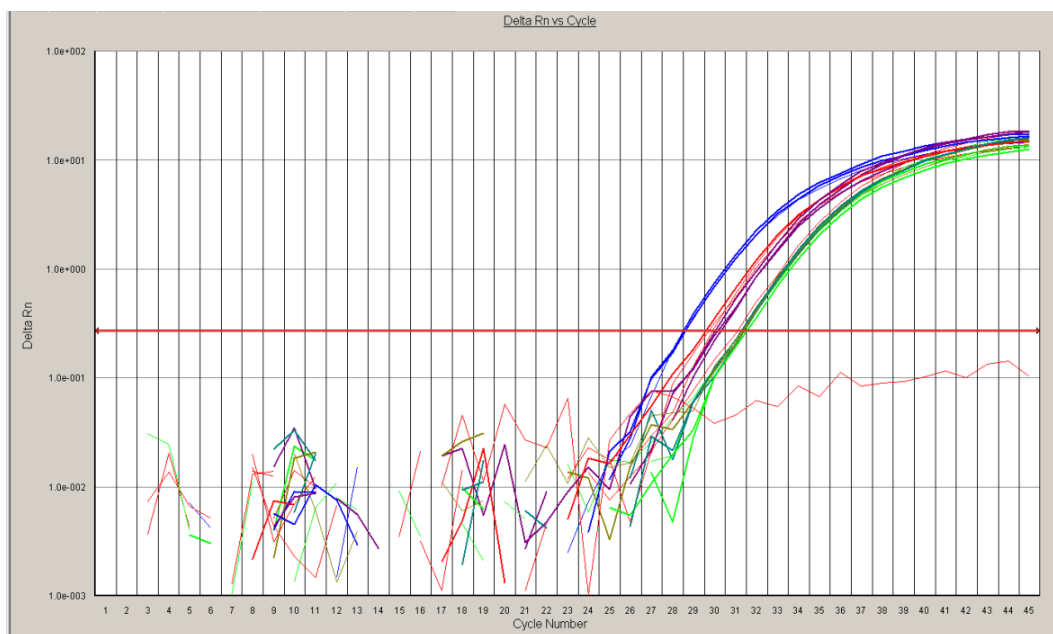
Se presentan las diluciones seriadas de DNA, sus correspondientes concentraciones y logaritmos, así como los valores de C<sub>T</sub> graficados en la Fig. 17 con los que se obtuvo la pendiente, y con ésta la eficiencia calculada como se indica en la columna de la extrema derecha.

De acuerdo a los datos de la Tabla 5 se determinó que en las reacciones para el análisis de la expresión de Na<sub>v</sub>1.5N se puede utilizar la misma concentración de cDNA con la que se realizaron los ensayos de qPCR para el resto de los CSDV, es decir, usando 3 μL de la dilución 1:4 de la solución *stock* de cDNA en un volumen final de reacción de 15 μL.

En el caso del ensayo para la isoforma Na<sub>v</sub>1.5A cabe destacar que estrictamente, no se usó cDNA como molde (recuérdese que es un plásmido), no obstante este análisis permite valorar la capacidad del ensayo al realizar la amplificación del gen de interés de forma exacta y acorde a diferentes concentraciones de molde. De hecho, una ventaja de hacer el análisis utilizando un vector de tamaño conocido con el gen de interés es que puede realizarse una curva patrón para conocer el número exacto de copias en una muestra problema, en caso de que el experimento así lo amerite.

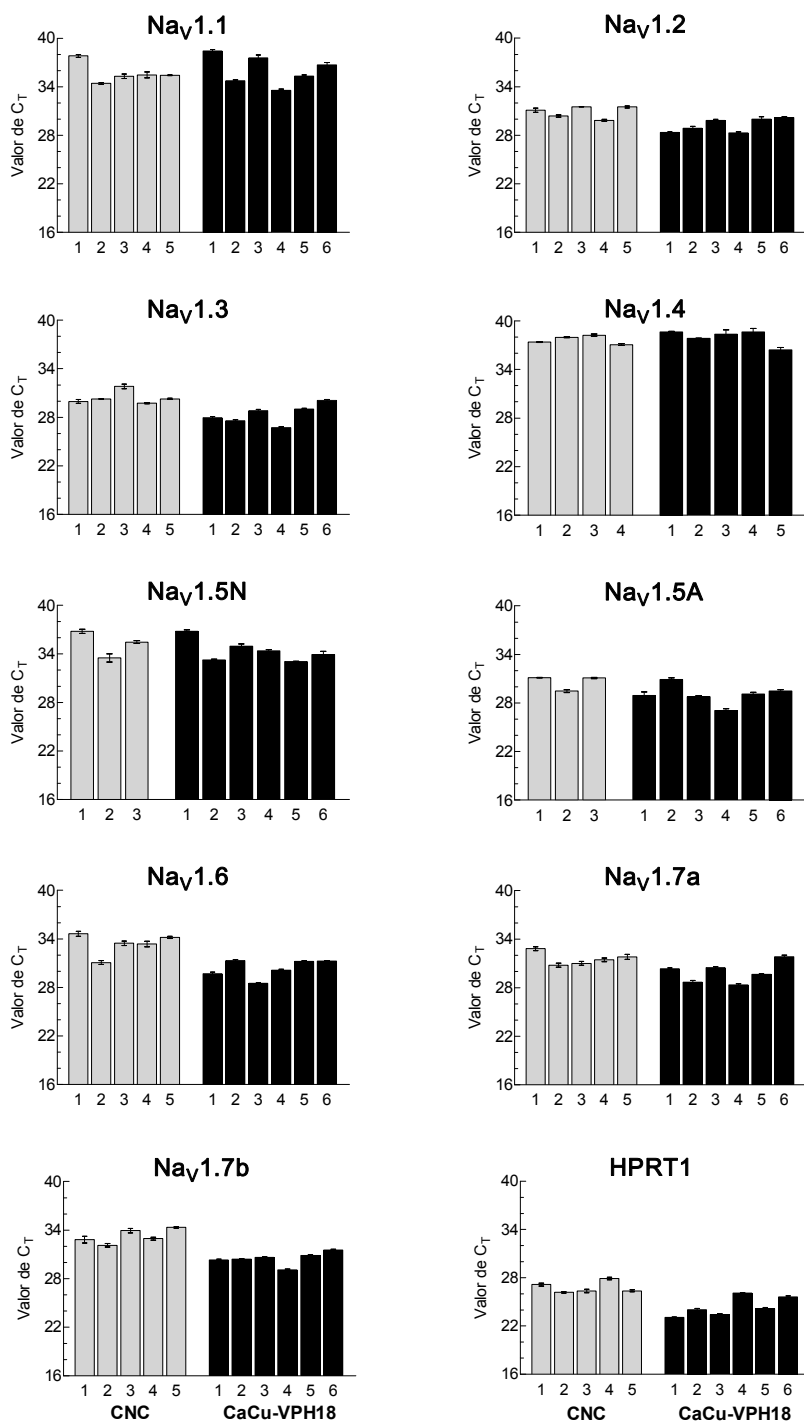
### Análisis de la Expresión de los CSDV

Al finalizar las reacciones de qPCR, el *software* del equipo de PCR en tiempo real proporciona las gráficas de  $\Delta R_n$  en función del  $C_T$  para cada reacción como se muestra en la Fig. 18. Sobre dicha gráfica el experimentador fija (con las consideraciones respectivas, ver sección de Metodología) el valor umbral para todas las reacciones de qPCR en cuestión (indicada por la línea roja en la Fig. 18). Así, los valores de  $C_T$  de para cada uno de los triplicados de cada reacción (proporcionados por el *software* con base en la línea umbral) se promediaron para obtener un valor de  $C_T$  por ensayo. Cuando la desviación estándar fue mayor a 0.4 la reacción se repitió nuevamente.

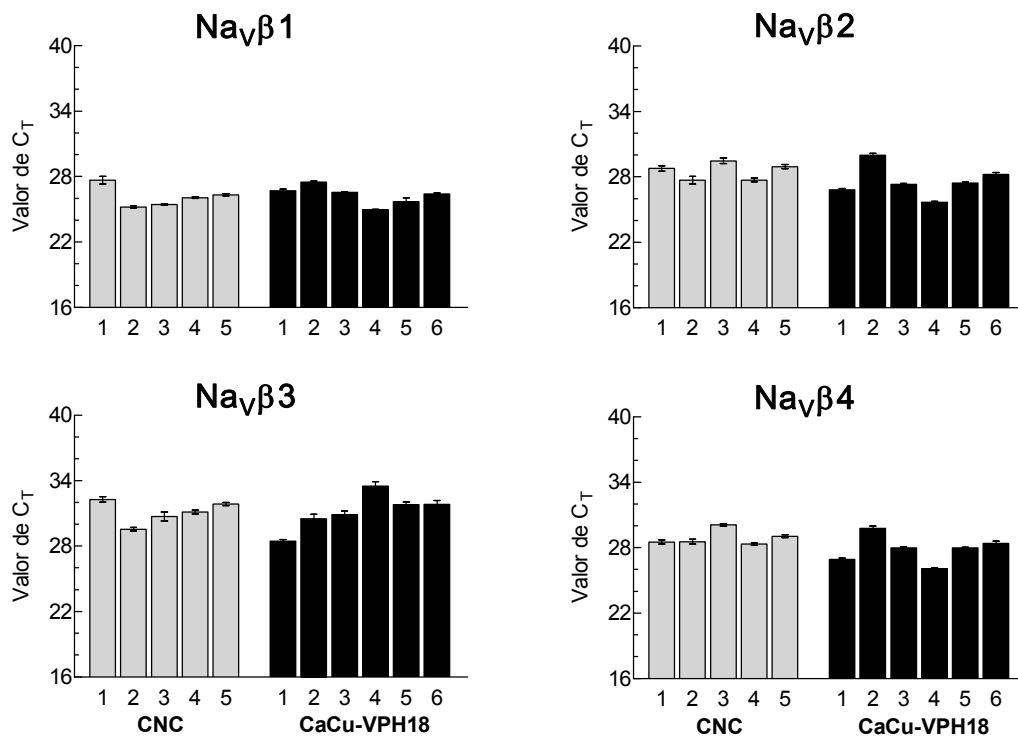


**Figura 18. Reacción de qPCR para  $Na_v1.6$  en muestras de CaCu.** Se muestra a manera de ejemplo la gráfica resultante de llevar a cabo la amplificación de un gen de interés, en este caso  $Na_v1.6$  en las muestras de CaCu positivas para VPH-18. La línea roja horizontal indica el umbral elegido para determinar los valores de  $C_T$  de cada reacción (representadas por cada una de las líneas de colores que cortan perpendicularmente la línea umbral).

Los valores promedio de  $C_T$  de cada una de las muestras, junto con su desviación estándar, fueron graficados para cada uno de los genes estudiados de las subunidades  $\alpha$  (Fig. 19) y  $\beta$  (Fig. 20) de los CSDV. Es importante recordar que el valor de  $C_T$  es inversamente proporcional a la cantidad de mensajero presente en la muestra para el gen en cuestión, en otras palabras, valores bajos de  $C_T$  indican que el mensajero es más abundante y viceversa.



**Figura 19.** Valor de  $C_T$  para cada una de las muestras analizadas por qPCR de los diferentes subunidades  $\alpha$  de los CSDV. Para cada mRNA se muestra el valor promedio de  $C_T \pm$  desviación estándar del triplicado de cada muestra. Las barras grises representan las muestras de cérvix no canceroso (CNC), mientras que las barras negras corresponden a las muestras de CaCu generado por VPH-18.



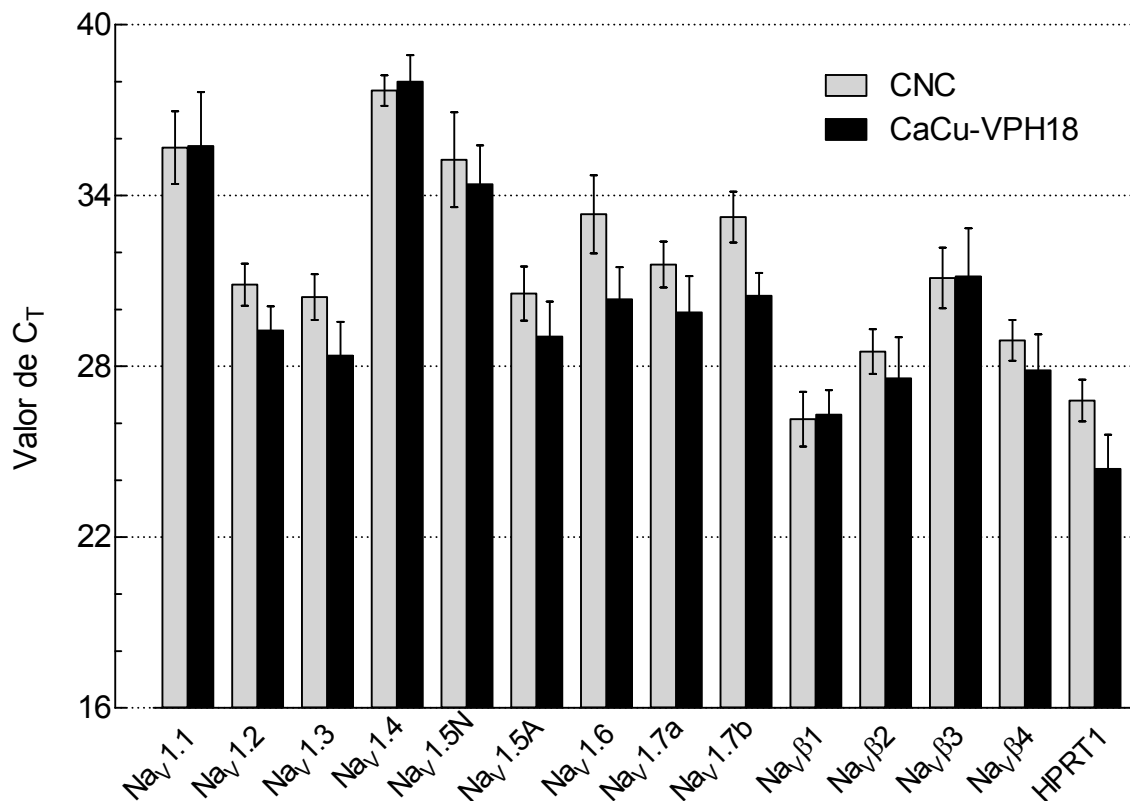
**Figura 20. Valor de  $C_T$  para cada una de las muestras analizadas por qPCR de los diferentes subunidades  $\beta$  de los CSDV.** Para cada mRNA se muestra el valor promedio de  $C_T \pm$  desviación estándar del triplicado de cada muestra. Las barras grises representan las muestras de cérvix no canceroso (CNC), mientras que las barras negras corresponden a las muestras de CaCu generado por VPH-18.

Los resultados muestran que en promedio, la mayoría de las subunidades de los CSDV presentan niveles de mRNA más altos en las muestras de CaCu-VP18 en comparación con las biopsias de CNC, es decir, los valores de  $C_T$  son menores en las muestras de CaCu. Interesantemente, los niveles de mRNA de las subunidades  $\beta$  (con excepción de  $Na_v\beta_3$ , Fig. 20) son más elevados que las mismas subunidades  $\alpha$ . De éstas,  $Na_v1.2$ ,  $Na_v1.3$  y  $Na_v1.5A$ ,  $Na_v1.7a$  y  $Na_v1.7b$  presentan valores de  $C_T$  en el intervalo considerado como genes de moderada expresión, en este mismo rango se encuentran los niveles del gen constitutivo HPRT1, mientras que  $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.4$  y  $Na_v1.5N$  son escasamente expresados.

Una comparación más global de los valores de  $C_T$  para cada mRNA entre muestras de CNC y de CaCu-VP18 se presenta en la Fig. 21. Ahí se puede apreciar que incluso, los valores de  $C_T$  del gen HPRT1 fueron más bajos en cáncer que en el cérvix no



canceroso ( $26.8 \pm 0.7$  y  $24.4 \pm 1.2$  para CNC y CaCu, respectivamente). En la misma figura se observa que las diferencias en los valores de  $C_T$  entre ambos grupos de muestras son pequeñas (incluso las desviaciones estándar se sobrelapan algunas veces), no obstante se debe considerar que aunque la escala de los valores de  $C_T$  es lineal, un cambio de un ciclo en el valor de  $C_T$  (por ejemplo de 27 a 26) indica que existe el doble de moléculas de mRNA en una muestra con respecto a la otra.



**Figura. 21. Expresión diferencial de los niveles de mRNA de CSDV y HPRT1 entre CNC y CaCu-VPH-18.** Se grafica el valor promedio de  $C_T \pm$  desviación estándar de cada gen en muestras de CNC ( $n = 3-5$ ) y CaCu-VPH18 ( $n = 5-6$ ). Nótese que con excepción de  $Na_V1.1$ ,  $Na_V1.4$ ,  $Na_V\beta1$  y  $Na_V\beta3$ , la mayoría de las subunidades de CSDV, incluso el gen constitutivo HPRT1, presentaron niveles de mensajero superiores en biopsias de CaCu que en las de CNC.

Por otro lado, las subunidades  $Na_V1.1$ ,  $Na_V1.4$ ,  $Na_V\beta1$  y  $Na_V\beta3$  se expresan en cantidades muy similares en ambos grupos de biopsias, mientras que el resto de los genes estudiados presentaron niveles de mensajero más altos (valores de  $C_T$  más bajos) en el CaCu que en el CNC (Fig. 21). Como se indicó en el párrafo anterior, el mensajero del gen HPRT1 presentó valores de  $C_T$  que difieren en más de 2 ciclos

entre las biopsias de CNC y CaCu-VP18, lo que se refleja en una diferencia de casi 6 veces en la cantidad de mensajero que se expresa en cáncer en comparación con el tejido no canceroso (Tabla 6), por esta razón se decidió utilizar el mensajero de  $\text{Na}_v\beta 1$  como gen normalizador dado que prácticamente no presentó variaciones en sus valores de  $C_T$  entre ambos grupos experimentales y los niveles de mRNA fueron similares a los del gen HPRT1 (Fig. 21).

Con base en estas consideraciones se calculó la expresión relativa de los mensajeros de los CSDV y del mismo HPRT1 por el método de  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . El resumen de dichas iteraciones se presenta en la Tabla 6. En primer lugar se calculó el  $\Delta C_T$  de ambos grupos de biopsias, esto se realizó restando el valor de  $C_T$  del gen normalizador o endógeno al valor de  $C_T$  de cada grupo de muestras con cada gen analizado. Luego se calculó el valor del  $\Delta\Delta C_T$  para cada gen restando el valor de  $\Delta C_T$  del control (CNC) al valor de  $\Delta C_T$  en CaCu. Finalmente el cambio (en número de veces) en los niveles de mensajero del gen en cuestión se obtiene al resolver la expresión matemática  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  para cada gen, y el resultado indica el número de veces que se expresa el mensajero en CaCu-VP18 en relación a las muestras de cérvix no canceroso. Los valores de expresión relativa de cada gen se grafican en la Fig. 22 para una mejor apreciación. Se puede observar que en el CaCu-VP18 la subunidad  $\text{Na}_v1.6$  fue la que presentó el mayor aumento en los niveles de mRNA de todos los genes estudiados (más de 8 veces respecto a CNC). La variante del gen  $\text{Na}_v1.7$ , nombrada aquí  $\text{Na}_v1.7b$ , le siguió en ese orden de aumentos (más de 7 veces respecto a CNC). Por su parte, el gen constitutivo HPRT1 se expresa casi seis veces más en CaCu que en las muestras control. El resto de las subunidades estudiadas también se sobreexpresan en CaCu-VP18 aunque de una manera más discreta. La excepción fue  $\text{Na}_v1.4$  cuyo valor de expresión relativa fue 0.89, lo que significa un aumento de la expresión de esta subunidad en las biopsias CNC respecto al CaCu-VP18 (1.12 veces).

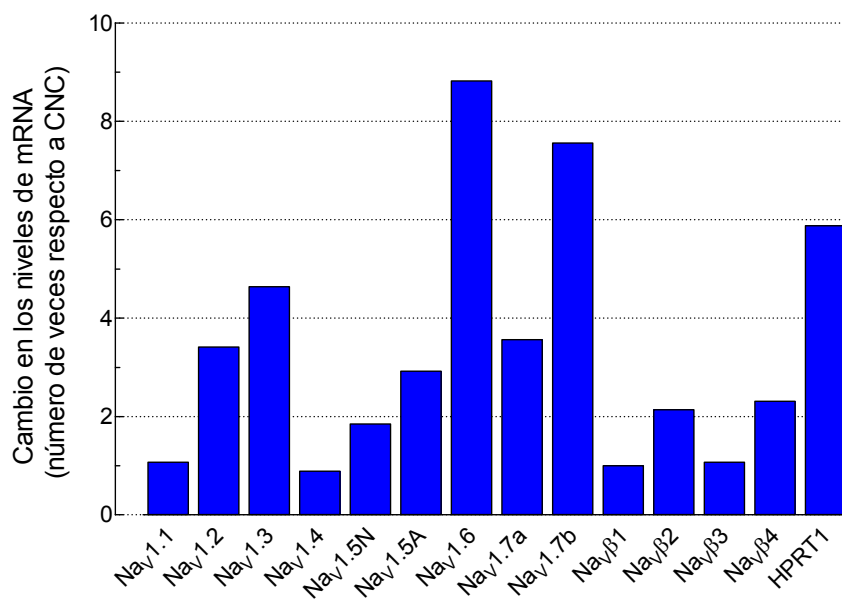
Finalmente, para comparar los resultados del presente estudio con los que nuestro laboratorio ha reportado previamente para CaCu-VP16, se elaboró una gráfica de barras comparativa (Fig. 23) que mostró un patrón de sobreexpresión de los CSDV en

ambos tipos de cáncer muy similar. En ambos tipos de cáncer, la mayor sobreexpresión se observa en la subunidad  $Na_v1.6$ , seguida por  $Na_v1.7b$  (Fig. 23). Interesantemente el cambio en los niveles de expresión del mensajero de  $Na_v1.6$  es menor en el CaCu-VPH18 que en el positivo para VPH-16. Sin embargo, el resto de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los CSDV, a excepción de  $Na_v\beta3$ , se sobreexpresan en mayor cantidad en el cáncer generado por VPH-18 (Fig. 23).

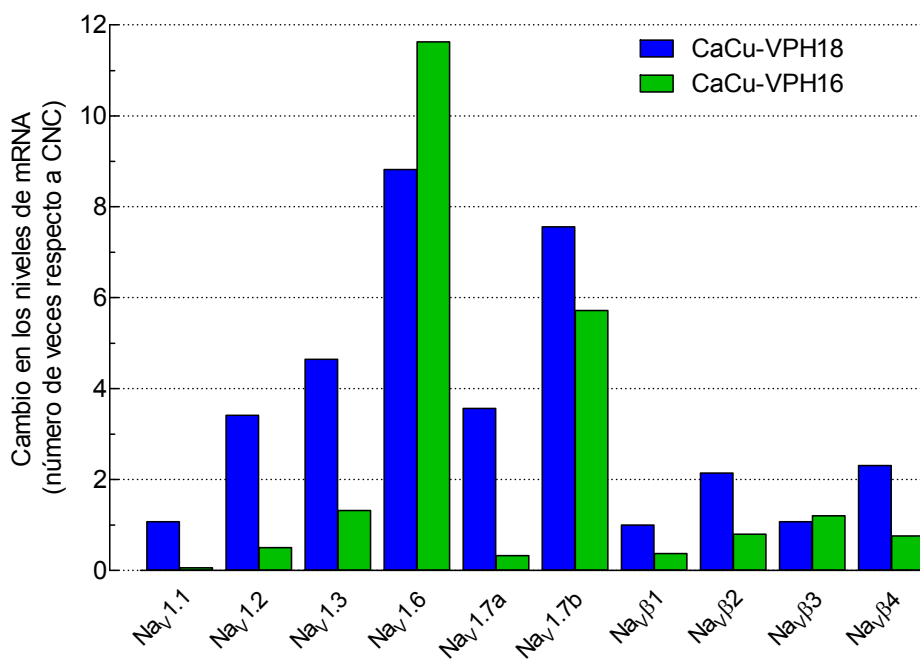
**Tabla 6. Análisis de la expresión relativa del mRNA de los CSDV por el método de  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ .**

mRNA	$C_T$		$\Delta C_T$ ( $C_T$ gen de interés - $C_T$ gen endógeno)		$\Delta\Delta C_T$ ( $\Delta C_T$ CaCu - $\Delta C_T$ CNC)	Expresión relativa ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ )
	CaCu	Control	CaCu	Control		
$Na_v1.1$	35.74	35.68	9.44	9.54	-0.10	<b>1.07</b>
$Na_v1.2$	29.26	30.87	2.96	4.73	-1.77	<b>3.41</b>
$Na_v1.3$	28.38	30.43	2.08	4.29	-2.21	<b>4.64</b>
$Na_v1.4$	38.01	37.69	11.70	11.54	0.16	<b>0.89</b>
$Na_v1.5A$	29.05	30.56	0.97	2.52	-1.55	<b>2.92</b>
$Na_v1.5N$	34.40	35.26	6.33	7.21	-0.89	<b>1.85</b>
$Na_v1.6$	30.36	33.34	4.06	7.20	-3.14	<b>8.82</b>
$Na_v1.7a$	29.90	31.58	3.60	5.43	-1.83	<b>3.56</b>
$Na_v1.7b$	30.48	33.24	4.18	7.10	-2.92	<b>7.56</b>
$Na_v\beta1$	26.30	26.15	0	0	0	<b>1.00</b>
$Na_v\beta2$	27.58	28.52	1.28	2.37	-1.09	<b>2.14</b>
$Na_v\beta3$	31.16	31.10	4.86	4.96	-0.10	<b>1.07</b>
$Na_v\beta4$	27.86	28.91	1.56	2.76	-1.21	<b>2.31</b>
HPRT1	24.40	26.80	-1.90	0.65	-2.56	<b>5.88</b>

Se muestra los datos utilizados y el procedimiento para calcular la expresión relativa de los genes estudiados por el método de  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  y utilizando al gen  $Na_v\beta1$  como gen normalizador. Los valores de expresión relativa (columna de la extrema derecha) indican el número de veces que cambió (aumento o disminución) la expresión del mensajero en el CaCu respecto al CNC. Los valores de  $C_T$  corresponden a los de la Fig. 21.



**Figura 22. Cambio en la expresión del mensajero de los CSDV en CaCu-VPH18 respecto a CNC.** Para cada subunidad analizada de los CSDV, así como para el gen HPRT1, se muestra el número de veces que aumentaron los niveles de mensajero en el CaCu respecto al cérvix no canceroso y normalizado con el gen  $Na_v\beta 1$ . Los valores de expresión relativa del eje de las ordenadas provienen de la Tabla 6.



**Figura 23. Comparación de los cambios en la expresión de los CSDV en CaCu generado por diferentes tipos de VPH.** Se grafican los resultados del cambio en la expresión para CaCu generado por VPH-18 (barras azules) con los ya reportados previamente CaCu generado por VPH-16 (barras verdes; (Hernández Plata, 2008). Las dos subunidades más sobreexpresadas en ambos casos son  $Na_v 1.6$  y  $Na_v 1.7b$ . Con excepción de estas dos, el resto de las subunidades de CSDV se sobreexpresan más en el CaCu-VPH18. Las subunidades  $Na_v 1.4$ ,  $Na_v 1.5N$  y  $Na_v 1.5A$  no se estudiaron en CaCu-VPH16.

## DISCUSIÓN

En este trabajo se reporta un aumento en la expresión de los niveles de mRNA de canales de sodio dependientes de voltaje en cáncer cervicouterino generado por el virus del papiloma humano tipo 18 en comparación con el cérvix no canceroso. La técnica de RT-PCR convencional permitió establecer la presencia del mensajero de la isoforma adulta del canal  $Na_v1.6$  en las biopsias de CaCu positivas para VPH-18, mientras que la utilización de la técnica de PCR en su versión cuantitativa (qPCR) reveló que los niveles del mensajero de  $Na_v1.6$  y  $Na_v1.7$  aumentan su expresión en más de 9 y 7 veces, respectivamente, en el CaCu-VPH18 respecto al CNC. Los resultados obtenidos permitieron comparar los niveles de expresión relativa de distintos canales de sodio dependientes de voltaje en el CaCu cuando éste se origina por la infección con VPH-18 o VPH-16. Interesantemente, en ambos tipos de cáncer las subunidades  $Na_v1.6$  y  $Na_v1.7b$  son las que presentan valores más altos de expresión respecto al CNC. La relevancia e implicaciones de estos resultados se discute a continuación.

El papel de los canales iónicos (activados por voltaje o ligando, principalmente) en varios aspectos cruciales del cáncer ha sido foco de un número cada vez más grande de investigaciones a nivel básico y clínico. Aunado a ello, el descubrimiento de nuevas funciones de las diferentes proteínas que conforman los canales iónicos ha planteado la utilización de éstos como potenciales marcadores moleculares y blancos terapéuticos de varios tipos de cáncer (Fraser & Pardo, 2008; Prevarskaya *et al.*, 2010). En particular, los CSDV se han propuesto como herramientas moleculares para la detección y tratamiento de cáncer de mama y de próstata (Diss *et al.*, 2005; Brackenbury *et al.*, 2007), y más recientemente se ha demostrado su sobreexpresión en cáncer de ovario y colon (Gao *et al.*, 2010; House *et al.*, 2010). Como una particularidad distintiva, el aumento en la capacidad metastásica de varias líneas celulares de cáncer se correlaciona con la aparición de canales y corrientes iónicas en la membrana plasmática característicos de membranas excitables, lo cual involucra principalmente a los CSDV. El papel de los CSDV en el CaCu no ha sido estudiado lo

suficiente, nuestro laboratorio reportó por primera vez que existe una sobreexpresión de dichos canales en CaCu-VPH16 respecto a CNC (Diaz *et al.*, 2007) y más recientemente que la subunidad que presenta una mayor regulación en este sentido es la  $Na_v1.6$  y  $Na_v1.7b$  (Hernández Plata, 2008); mientras que los resultados más recientes demuestran que la proteína del canal  $Na_v1.6$  es funcional en la membrana plasmática de cultivos primarios de CaCu-VPH16 y que podría ser relevante para la capacidad invasiva de este carcinoma (Hernandez-Plata *et al.*, 2011).

En el presente trabajo se continúa la investigación del papel de los CSDV en el CaCu extendiendo los estudios al carcinoma originado por la infección del VPH-18. Los resultados mostraron que al igual que en el CaCu-VPH16 el mensajero de los canales  $Na_v1.6$  y  $Na_v1.7b$  son los que se sobreexpresan en mayor medida en el CaCu-VPH18 con respecto al tejido cervical no canceroso, sin embargo, la sobreexpresión de subunidades como  $Na_v1.2$ ,  $Na_v1.3$  y  $Na_v1.7a$  es más marcada en este cáncer que en lo que se observó en CaCu-VPH16 (Fig. 23).

Mención aparte merece la cuantificación de las isoformas de la subunidad  $Na_v1.5$  (uno de los tres CSDV resistentes a la TTX). No obstante que la variante neonatal ( $Na_v1.5N$ ) presentó valores de  $C_T$  que lo ubican como un gen pobremente expresado ( $C_T \geq 34$ ), la variante adulta ( $Na_v1.5A$ ) mostró niveles de mRNA más abundantes ( $C_T$  cercano a 28 en CaCu-VPH18, Fig. 21), por lo que es posible la expresión de proteínas funcionales de este canal en la membrana plasmática de las células de CaCu-VPH18. En este sentido, utilizando técnicas para monitorear la actividad (patch clamp) o presencia (inmunohistoquímica e inmunocitoquímica) de canales  $Na_v1.5$  funcionales en células y biopsias de CaCu-VPH16 no se ha encontrado evidencia de ello (Diaz *et al.*, 2007; Hernandez-Plata *et al.*, 2011), a pesar de que resultados preliminares muestran valores de  $C_T$  parecidos a los reportados en la presente investigación (Hernandez-Plata, comunicación personal). Por lo tanto, para determinar si en el CaCu-VPH18 existe una expresión funcional de los canales  $Na_v1.5$  se requieren realizar experimentos adicionales. De hecho, esta incógnita aplica para el resto de los canales de sodio cuyas

subunidades  $\alpha$  han sido cuantificadas en este trabajo, el cual se enfocó exclusivamente en investigar los niveles de mRNA de dichas proteínas.

En lo que concierne a las subunidades  $\beta$  de los CSDV, en el presente trabajo se encontró que la expresión relativa de estas subunidades auxiliares fue mayor en CaCu-VPH18 que en CaCu-VPH16, con la excepción de  $\text{Na}_v\beta 3$  cuyo cambio en los niveles de mRNA fueron prácticamente idénticos en ambos tipos de CaCu (Fig. 23). Como se puso de manifiesto en el apartado de Introducción de esta disertación, las subunidades  $\beta$  desempeñan funciones relacionadas con la adhesión celular, por lo que el aumento más marcado en los niveles de mRNA de las subunidades  $\text{Na}_v\beta 2$  y  $\text{Na}_v\beta 4$ , en particular, podría ser relevante para las propiedades metastásicas del CaCu-VPH18. Aunque la mayoría de las evidencias involucran a la subunidad  $\text{Na}_v\beta 1$  en las propiedades de adhesión e invasividad, también existen reportes para las otras tres subunidades  $\beta$  (para una revisión véase Brackenbury *et al.*, 2008b). Estas diferencias sugieren la probabilidad de que exista una expresión diferencial de los CSDV en función del tipo de virus que dé lugar al cáncer cervicouterino.

Una observación adicional referente a las subunidades  $\beta$  lo representa el hecho de que la abundancia relativa de estas subunidades, al menos a nivel de mensajero, fue más alta que la de la mayoría de las subunidades  $\alpha$ , y en el caso de  $\text{Na}_v\beta 1$  al mismo nivel que HPRT1 (Fig. 21). Considerando que estas subunidades accesorias son multifuncionales, ya que además de cumplir con las funciones canónicas en la regulación del tráfico y función de las subunidades  $\alpha$ , también desempeñan un papel relevante en la interacción con moléculas de adhesión, matriz extracelular y el citoesqueleto (Catterall *et al.*, 2005; Brackenbury *et al.*, 2008b), cabe la posibilidad de que las subunidades  $\beta$  estén involucradas en algún proceso de la biología del CaCu, pues recientemente se reportó que tienen un papel importante en la capacidad invasiva en líneas celulares de cáncer de próstata y de mama. En el primer caso, se encontró que las cuatro subunidades  $\beta$  se encuentran sobreexpresadas (especialmente  $\text{Na}_v\beta 1$ ) en líneas celulares de cáncer de próstata altamente metastásicas con respecto a

aquellas con baja capacidad invasiva. Esto sugiere que  $\text{Na}_v\beta 1$  interactúa con  $\text{Na}_v 1.7$  (principal subunidad  $\alpha$  sobreexpresada en éstas líneas celulares) incrementando su actividad y potenciando la capacidad invasiva (Diss *et al.*, 2008). En el caso del cáncer de mama, se ha observado que la subunidad  $\text{Na}_v\beta 1$  es sobreexpresada en células MCF-7 con bajo potencial metastásico en comparación con las MDA-MB-231 altamente metastásicas. Con lo anterior se propuso que  $\text{Na}_v\beta 1$  funciona como molécula de adhesión, aumentando la agregación celular y disminuyendo la movilidad de las mismas (Chioni *et al.*, 2009). Estudios adicionales tendrán que realizarse para elucidar el papel que juegan las subunidades  $\beta$  en la biología del CaCu.

En la actualidad aún existen muchas interrogantes acerca del mecanismo por el cual la infección por VPH puede derivar en la generación de CaCu, y de cómo es que se produce la regulación de la expresión genética en las células infectadas. No obstante, existen evidencias que sugieren diferencias en la forma preferencial en que se encuentra el genoma viral en la célula infectada dependiendo del tipo de VPH. En la mayoría de los casos el genoma de VPH-18 se encuentra integrado en el material genético celular, mientras que el de VPH-16 puede encontrarse tanto de forma episomal como inserto en el genoma celular (Woodman *et al.*, 2007). También se ha visto que la integración del genoma viral no se lleva a cabo siempre en el mismo lugar del material genético del hospedero. Algunos estudios han encontrado que la banda cromosomal 8q24 es el sitio de integración del genoma viral en aproximadamente el 30% de los casos de CaCu generado por VPH-18 (Ferber *et al.*, 2003; Ferber *et al.*, 2004), sin embargo esto no se observa con los casos de CaCu generado por VPH-16, y por lo general la integración del genoma de cualquier tipo de VPH ocurre en sitios diferentes sin seguir un patrón. Al parecer la única característica que comparten todos los sitios de integración del genoma viral es que se trata de regiones frágiles en los cromosomas (regiones que se tienden a romper con mayor frecuencia que el resto del cromosoma) (Woodman *et al.*, 2007). Es probable que estas diferencias en la infección por diversos tipos de VPH, sumado a las variaciones que existen en sus proteínas,



determinen la regulación diferencial de ciertos genes en el tejido infectado, incluyendo a los CSDV.

Debido a la considerable diferencia en la expresión del gen endógeno HPRT1 en CaCu con respecto al cérvix no canceroso, no se pudo utilizar este gen como control normalizador. Sin embargo, al estudiar la expresión de los CSDV en ambos grupos de muestras, se encontró que  $Na_v\beta 1$  puede ser considerado como gen normalizador al tener un nivel de expresión muy similar en todas las muestras y expresarse a niveles comparables con el mismo HPRT1 (Fig. 21) y otros genes constitutivos (Valente *et al.*, 2009). En consecuencia, en futuros experimentos puede considerarse el uso del gen  $Na_v\beta 1$  como gen normalizador cuando se pretenda hacer algún estudio de expresión relativa en CaCu-VPH18, comparada con la expresión en tejido no canceroso.

En resumen, los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis indican que el 70% de los casos de CaCu (54% VPH-16 más 17% de VPH-18) se caracterizan por presentar una expresión aumentada (en más 8 veces) del mensajero de las subunidades  $Na_v1.6$  y  $Na_v1.7b$  con respecto al cérvix no canceroso. Por lo tanto, el uso de estas dos subunidades de los CSDV, y en particular la de  $Na_v1.6$ , como potenciales marcadores moleculares para la detección temprana del CaCu y su posible uso como blancos para estrategias terapéuticas constituye una nueva posibilidad para el control y disminución de este problema de salud pública en nuestro país.

## CONCLUSIONES

Los niveles de mRNA de canales de sodio dependientes de voltaje se encuentran expresados de forma diferencial en el CaCu generado por VPH-18, en particular el mensajero de la subunidad  $\alpha$  que conforma el canal  $\text{Na}_v1.6$  aumenta su expresión en más de 8 veces en comparación con el tejido no canceroso.

El mRNA de la subunidad  $\text{Na}_v1.6$  puede ser utilizado como marcador molecular para la detección del cáncer cervicouterino generado por infección con el VPH-16 o 18, lo que representa el 70% de los casos totales de CaCu.

El mensajero de la subunidad  $\text{Na}_v1.7b$  también se incrementa en aproximadamente 7 veces con la aparición del CaCu-VPH18.

Además del mRNA de subunidades de CSDV sensibles a la TTX, el CaCu-VPH18 también se caracteriza por expresar (el mensajero de) un CSDV resistente a la TTX, la isoforma  $\text{Na}_v1.5A$ .

Resta por investigar la presencia de la proteína de los CSDV y su posible papel en las propiedades de proliferación, migración e invasividad del CaCu-VPH18.

## REFERENCIAS

- Aidley, D.J. and P.R. Stanfield.** 1996. *Ion Channels, Molecules In Action.* Cambridge University Press, New York.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter.** 2008. *Molecular Biology of The Cell.* Fifth Edition ed. Garland Publishing.
- Alonso De Ruiz, P. and E. Lazcano.** 2005. *Cáncer Cervicouterino: diagnóstico, prevención y control.* 2a edición ed. Médica Panamericana.
- Arends, M.J., Wyllie, A.H., & Bird, C.C.** 1995. Human papillomavirus type 18 is associated with less apoptosis in fibroblast tumours than human papillomavirus type 16. *Br J Cancer* 72:646-649.
- Bertolesi, G.E., Shi, C., Elbaum, L., Jollimore, C., Rozenberg, G., Barnes, S., & Kelly, M.E.** 2002. The Ca(2+) channel antagonists mibefradil and pimozone inhibit cell growth via different cytotoxic mechanisms. *Mol Pharmacol* 62:210-219.
- Brackenbury, W.J., Chioni, A.M., Diss, J.K., & Djamgoz, M.B.** 2007. The neonatal splice variant of Nav1.5 potentiates in vitro invasive behaviour of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 101:149-160.
- Brackenbury, W.J., Davis, T.H., Chen, C., Slat, E.A., Detrow, M.J., Dickendesher, T.L., Ranscht, B., & Isom, L.L.** 2008a. Voltage-gated Na<sup>+</sup> channel beta1 subunit-mediated neurite outgrowth requires Fyn kinase and contributes to postnatal CNS development in vivo. *J Neurosci* 28:3246-3256.
- Brackenbury, W.J., Djamgoz, M.B., & Isom, L.L.** 2008b. An emerging role for voltage-gated Na<sup>+</sup> channels in cellular migration: regulation of central nervous system development and potentiation of invasive cancers. *Neuroscientist* 14:571-583.
- Brackenbury, W.J. & Isom, L.L.** 2008. Voltage-gated Na<sup>+</sup> channels: potential for beta subunits as therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets* 12:1191-1203.
- Cambien, B., Rezzonico, R., Vitale, S., Rouzaire-Dubois, B., Dubois, J.M., Barthel, R., Karimjee, B.S., Mograbi, B., Schmid-Alliana, A., & Schmid-Antomarchi, H.** 2008. Silencing of hSlo potassium channels in human osteosarcoma cells promotes tumorigenesis. *Int J Cancer* 123:365-371.
- Campo, M.S.** 2006. *Papillomavirus Research: From Natural History To Vaccines and Beyond.* Caister Academic Press.
- Catterall, W.A.** 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26:13-25.
- Catterall, W.A., Goldin, A.L., & Waxman, S.G.** 2003. International Union of Pharmacology. XXXIX. Compendium of voltage-gated ion channels: sodium channels. *Pharmacol Rev* 55:575-578.
- Catterall, W.A., Goldin, A.L., & Waxman, S.G.** 2005. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels. *Pharmacol Rev* 57:397-409.
- Chioni, A.M., Brackenbury, W.J., Calhoun, J.D., Isom, L.L., & Djamgoz, M.B.** 2009. A novel adhesion molecule in human breast cancer cells: voltage-gated Na<sup>+</sup> channel beta1 subunit. *Int J Biochem Cell Biol* 41:1216-1227.
- Chioni, A.M., Shao, D., Grose, R., & Djamgoz, M.B.** 2010. Protein kinase A and regulation of neonatal Nav1.5 expression in human breast cancer cells: activity-dependent positive feedback and cellular migration. *Int J Biochem Cell Biol* 42:346-358.
- D'Andrilli, G., Bovicelli, A., & Giordano, A.** 2010. HPV vaccines: state of the art. *J Cell Physiol* 224:601-604.
- Demarteau, N., Detournay, B., Tehard, B., El, H.A., & Standaert, B.** 2010. A generally applicable cost-effectiveness model for the evaluation of vaccines against cervical cancer. *Int J Public Health.*

- Diaz, D., Delgadillo, D.M., Hernandez-Gallegos, E., Ramirez-Dominguez, M.E., Hinojosa, L.M., Ortiz, C.S., Berumen, J., Camacho, J., & Gomora, J.C. 2007. Functional expression of voltage-gated sodium channels in primary cultures of human cervical cancer. *J Cell Physiol* 210:469-478.
- Diss, J.K., Fraser, S.P., Walker, M.M., Patel, A., Latchman, D.S., & Djamgoz, M.B. 2008. Beta-subunits of voltage-gated sodium channels in human prostate cancer: quantitative in vitro and in vivo analyses of mRNA expression. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 11:325-333.
- Diss, J.K., Stewart, D., Pani, F., Foster, C.S., Walker, M.M., Patel, A., & Djamgoz, M.B. 2005. A potential novel marker for human prostate cancer: voltage-gated sodium channel expression in vivo. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 8:266-273.
- Djamgoz, M.B.A., Mycielska, M., Madeja, Z., Fraser, S.P., & Korohoda, W. 2001. Directional movement of rat prostate cancer cells in direct-current electric field: involvement of voltagegated Na<sup>+</sup> channel activity. *J Cell Sci* 114:2697-2705.
- Dorak, M.T. 2006. Real-time PCR. Taylor & Francis Group.
- Farias, L.M., Ocana, D.B., Diaz, L., Larrea, F., Avila-Chavez, E., Cadena, A., Hinojosa, L.M., Lara, G., Villanueva, L.A., Vargas, C., Hernandez-Gallegos, E., Camacho-Arroyo, I., Duenas-Gonzalez, A., Perez-Cardenas, E., Pardo, L.A., Morales, A., Taja-Chayeb, L., Escamilla, J., Sanchez-Pena, C., & Camacho, J. 2004. Ether a go-go potassium channels as human cervical cancer markers. *Cancer Res* 64:6996-7001.
- Ferber, M.J., Eilers, P., Schuurin, E., Fenton, J.A., Fleuren, G.J., Kenter, G., Szuhai, K., Smith, D.I., Raap, A.K., & Brink, A.A. 2004. Positioning of cervical carcinoma and Burkitt lymphoma translocation breakpoints with respect to the human papillomavirus integration cluster in FRA8C at 8q24.13. *Cancer Genet Cytogenet* 154:1-9.
- Ferber, M.J., Thorland, E.C., Brink, A.A., Rapp, A.K., Phillips, L.A., McGovern, R., Gostout, B.S., Cheung, T.H., Chung, T.K., Fu, W.Y., & Smith, D.I. 2003. Preferential integration of human papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. *Oncogene* 22:7233-7242.
- Fraser, S.P., Diss, J.K., Chioni, A.M., Mycielska, M.E., Pan, H., Yamaci, R.F., Pani, F., Siwy, Z., Krasowska, M., Grzywna, Z., Brackenbury, W.J., Theodorou, D., Koyuturk, M., Kaya, H., Battaloglu, E., De Bella, M.T., Slade, M.J., Tolhurst, R., Palmieri, C., Jiang, J., Latchman, D.S., Coombes, R.C., & Djamgoz, M.B. 2005. Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 11:5381-5389.
- Fraser, S.P. & Pardo, L.A. 2008. Ion channels: functional expression and therapeutic potential in cancer. Colloquium on Ion Channels and Cancer. *EMBO Rep* 9:512-515.
- Gao, R., Shen, Y., Cai, J., Lei, M., & Wang, Z. 2010. Expression of voltage-gated sodium channel alpha subunit in human ovarian cancer. *Oncol Rep* 23:1293-1299.
- Grimes, J.A., Fraser, S.P., Stephens, G.J., Downing, J.E., Laniado, M.E., Foster, C.S., Abel, P.D., & Djamgoz, M.B. 1995. Differential expression of voltage-activated Na<sup>+</sup> currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro. *FEBS Lett* 369:290-294.
- Hakim, A.A. & Dinh, T.A. 2009. Worldwide impact of the human papillomavirus vaccine. *Curr Treat Options Oncol* 10:44-53.
- Han, X.B., Wang, F., Yao, W.X., Liu, Y.Q., Wang, G., & Ma, D. 2006. [Inhibitory effects of tetraethylammonium on proliferation and voltage-gated potassium channels in human cervical carcinoma cell line SiHa]. *Ai Zheng* 25:451-455.
- Hernandez Plata E. Expresión diferencial de canales de sodio dependientes de voltaje en cáncer cervicouterino. 2008. Tesis de Maestria. Instituto de Fisiología Celular, UNAM. México.

- Hernández Plata, E.** Expresión diferencial de canales de sodio dependientes de voltaje en cáncer cervicouterino. 2008. Tesis de Maestría. Instituto de Fisiología Celular, UNAM. México.
- Hernandez-Plata, E., Sharon-Ortiz C., Marquina-Castillo B., Medina-Martinez I.Y., Alfaro Cruz A., Berumen J., Rivera M., & Gomora J.C.** 2011. Contribution of functional Nav1.6 channels to cervical cancer invasiveness. *En preparación.*
- Hille, B.** 2001. Ion Channels of Excitable Membranes. Third edition ed.
- House, C.D., Vaske, C.J., Schwartz, A.M., Obias, V., Frank, B., Luu, T., Sarvazyan, N., Irby, R., Strausberg, R.L., Hales, T.G., Stuart, J.M., & Lee, N.H.** 2010. Voltage-Gated Na<sup>+</sup> Channel SCN5A Is a Key Regulator of a Gene Transcriptional Network That Controls Colon Cancer Invasion. *Cancer Res.*
- Huang, J.B., Kindzelskii, A.L., Clark, A.J., & Petty, H.R.** 2004. Identification of channels promoting calcium spikes and waves in HT1080 tumor cells: their apparent roles in cell motility and invasion. *Cancer Res* 64:2482-2489.
- Isom, L.L.** 2001. Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist* 7:42-54.
- Laniado, M.E., Fraser, S.P., & Djamgoz, M.B.** 2001. Voltage-gated K(+) channel activity in human prostate cancer cell lines of markedly different metastatic potential: distinguishing characteristics of PC-3 and LNCaP cells. *Prostate* 46:262-274.
- Laniado, M.E., Lalani, E.N., Fraser, S.P., Grimes, J.A., Bhangal, G., Djamgoz, M.B., & Abel, P.D.** 1997. Expression and functional analysis of voltage-activated Na<sup>+</sup> channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion in vitro. *Am J Pathol* 150:1213-1221.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. *Methods* 25:402-408.
- Mao, J., Chen, L., Xu, B., Wang, L., Wang, W., Li, M., Zheng, M., Li, H., Guo, J., Li, W., Jacob, T.J., & Wang, L.** 2009. Volume-activated chloride channels contribute to cell-cycle-dependent regulation of HeLa cell migration. *Biochem Pharmacol* 77:159-168.
- Mariot, P., Vanoverberghe, K., Lalevee, N., Rossier, M.F., & Prevarskaya, N.** 2002. Overexpression of an alpha 1H (Cav3.2) T-type calcium channel during neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells. *J Biol Chem* 277:10824-10833.
- Meyer, R., Schonherr, R., Gavrilova-Ruch, O., Wohlrab, W., & Heinemann, S.H.** 1999. Identification of ether a go-go and calcium-activated potassium channels in human melanoma cells. *J Membr Biol* 171:107-115.
- Morton, M.E., Cassidy, T.N., Froehner, S.C., Gilmour, B.P., & Laurens, R.L.** 1994. Alpha 1 and alpha 2 Ca<sup>2+</sup> channel subunit expression in human neuronal and small cell carcinoma cells. *FASEB J* 8:884-888.
- Munoz, N., Bosch, F.X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K.V., Snijders, P.J., & Meijer, C.J.** 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348:518-527.
- Oguro-Okano, M., Griesmann, G.E., Wieben, E.D., Slaymaker, S.J., Snutch, T.P., & Lennon, V.A.** 1992. Molecular diversity of neuronal-type calcium channels identified in small cell lung carcinoma. *Mayo Clin Proc* 67:1150-1159.
- Ouadid-Ahidouch, H., Chaussade, F., Roudbaraki, M., Slomianny, C., Dewailly, E., Delcourt, P., & Prevarskaya, N.** 2000. KV1.1 K(+) channels identification in human breast carcinoma cells: involvement in cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 278:272-277.
- Ousingsawat, J., Spitzner, M., Schreiber, R., & Kunzelmann, K.** 2008. Upregulation of colonic ion channels in APC (Min/+) mice. *Pflugers Arch* 456:847-855.

- Palacio-Mejia, L.S., Lazcano-Ponce, E., Allen-Leigh, B., & Hernandez-Avila, M. 2009. [Regional differences in breast and cervical cancer mortality in Mexico between 1979-2006]. *Salud Publica Mex* 51 Suppl 2:s208-s219.
- Palacio-Mejia, L.S., Rangel-Gomez, G., Hernandez-Avila, M., & Lazcano-Ponce, E. 2003. Cervical cancer, a disease of poverty: mortality differences between urban and rural areas in Mexico. *Salud Publica Mex* 45 Suppl 3:S315-S325.
- Pardo, L.A., Contreras-Jurado, C., Zientkowska, M., Alves, F., & Stuhmer, W. 2005. Role of voltage-gated potassium channels in cancer. *J Membr Biol* 205:115-124.
- Plummer, N.W., Gait, J., Jones, J.M., Burgess, D.L., Sprunger, L.K., Kohrman, D.C., & Meisler, M.H. 1998. Exon organization, coding sequence, physical mapping, and polymorphic intragenic markers for the human neuronal sodium channel gene SCN8A. *Genomics* 54:287-296.
- Prevarskaya, N., Skryma, R., & Shuba, Y. 2010. Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends Mol Med* 16:107-121.
- Quinn, M.A., Benedet, J.L., Odicino, F., Maisonneuve, P., Beller, U., Creasman, W.T., Heintz, A.P., Ngan, H.Y., & Pecorelli, S. 2006. Carcinoma of the cervix uteri. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet* 95 Suppl 1:S43-103.
- Roden, R. & Wu, T.C. 2006. How will HPV vaccines affect cervical cancer? *Nat Rev Cancer* 6:753-763.
- Roger, S., Besson, P., & Le Guennec, J.Y. 2003. Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. *Biochim Biophys Acta* 1616:107-111.
- Roger, S., Potier, M., Vandier, C., Besson, P., & Le Guennec, J.Y. 2006. Voltage-gated sodium channels: new targets in cancer therapy? *Curr Pharm Des* 12:3681-3695.
- Roger, S., Rollin, J., Barascu, A., Besson, P., Raynal, P.I., lochmann, S., Lei, M., Bougnoux, P., Gruel, Y., & Le Guennec, J.Y. 2007. Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines. *Int J Biochem Cell Biol* 39:774-786.
- Schiffman, M., Castle, P.E., Jeronimo, J., Rodriguez, A.C., & Wacholder, S. 2007. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 370:890-907.
- Shen, M.R., Droogmans, G., Eggermont, J., Voets, T., Ellory, J.C., & Nilius, B. 2000. Differential expression of volume-regulated anion channels during cell cycle progression of human cervical cancer cells. *J Physiol* 529 Pt 2:385-394.
- Stanley, M.A., Pett, M.R., & Coleman, N. 2007. HPV: from infection to cancer. *Biochem Soc Trans* 35:1456-1460.
- Taylor, J.T., Huang, L., Pottle, J.E., Liu, K., Yang, Y., Zeng, X., Keyser, B.M., Agrawal, K.C., Hansen, J.B., & Li, M. 2008a. Selective blockade of T-type Ca<sup>2+</sup> channels suppresses human breast cancer cell proliferation. *Cancer Lett* 267:116-124.
- Taylor, J.T., Zeng, X.B., Pottle, J.E., Lee, K., Wang, A.R., Yi, S.G., Scruggs, J.A., Sikka, S.S., & Li, M. 2008b. Calcium signaling and T-type calcium channels in cancer cell cycling. *World J Gastroenterol* 14:4984-4991.
- Tseng, T.T., McMahon, A.M., Johnson, V.T., Mangubat, E.Z., Zahm, R.J., Pacold, M.E., & Jakobsson, E. 2007. Sodium channel auxiliary subunits. *J Mol Microbiol Biotechnol* 12:249-262.
- Valente, V., Teixeira, S.A., Neder, L., Okamoto, O.K., Oba-Shinjo, S.M., Marie, S.K., Scrideli, C.A., Paco-Larson, M.L., & Carlotti, C.G., Jr. 2009. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. *BMC Mol Biol* 10:17.
- Villa, L.L. 2010. HPV prophylactic vaccination: The first years and what to expect from now. *Cancer Lett*.

**Wang, X.T., Nagaba, Y., Cross, H.S., Wrba, F., Zhang, L., & Guggino, S.E.** 2000. The mRNA of L-type calcium channel elevated in colon cancer: protein distribution in normal and cancerous colon. *Am J Pathol* 157:1549-1562.

**Woodman, C.B., Collins, S.I., & Young, L.S.** 2007. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7:11-22.