



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR

**EL CANAL DE SODIO Nav1.6 PROMUEVE LA INVASIVIDAD DEL CÁNCER
CERVICOUTERINO MEDIANTE LA SECRECIÓN DE LA
METALOPROTEINASA DE MATRIZ EXTRACELULAR TIPO 2**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
OSBALDO LÓPEZ CHARCAS**

**DIRECTOR DE TESIS
DR. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ
INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR**

COMITÉ TUTOR

**DR. JAIME BERUMEN CAMPOS
FACULTAD DE MEDICINA**

**DR. ÁNGEL ZARAIN HERZBERG
FACULTAD DE MEDICINA**

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Octubre 2018.



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 está 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.

*A la memoria de mis padres, María de Jesús y Gilberto,
ojalá el tiempo les hubiera alcanzado para estar aquí.*

*Dedicado a Sarahí,
la luz de mi vida.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a México, por ser un país enormemente rico que todo lo da, a la Universidad Nacional Autónoma de México, la gran madre latinoamericana, al Instituto de Fisiología Celular, la escuela de los críticos pensadores, al Hospital General de México, por hacer hasta lo imposible por sus pacientes, al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, por su eminencia formativa, al CONACyT por la beca que me fue otorgada, a los financiamientos de esta investigación: PAPIIT-UNAM IN207614 e IN206917 y CONACYT 167790,

al Dr. Juan Carlos Gómora Martínez, por todo lo que me ha dado en esta maravillosa estancia, por mostrarme el magnífico mundo de la electrofisiología de los canales iónicos, por la libertad que me otorgó, por sus enseñanzas, por ser el mentor y el amigo, gracias Chief!

al Dr. Jaime Berumen Campos, miembro de mi Comité Tutor, por abrir las puertas de su laboratorio en el Hospital General de México, por su contribución intelectual y logística para lograr este trabajo.

al Dr. Ángel Zarain Herzberg, miembro de mi Comité Tutor, por todas sus asesorías y recomendaciones que enriquecieron este trabajo.

a la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia por sus recomendaciones y apoyo durante mi formación académica,

a la Dra. Leticia Rocha Zavaleta por su empatía, por sus palabras y por su apoyo académico,

al Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo por sus recomendaciones, consejos y apoyo durante la fase final de mi formación,

a la M. en C. Sarahí Rosas-González por sus recomendaciones para mejorar este manuscrito,

a la Dra. Zazil Herrera-Carrillo por su incalculable apoyo para que este trabajo avanza,

al Dr. Everardo Hernández-Plata por su excelente asesoría académica,

al Dr. Manuel H. Rivera por compartir su conocimiento y enriquecer las discusiones académicas y el intercambio de ideas,

a la Dra. Belén Ernestina Ramírez Cordero por su ayuda con los experimentos de PCR,

a la Sra. Melanie Gómora García por el trabajo artístico incluido en esta tesis,

a la M. en C. Margarita Rosendo por la consulta externa y el intercambio de ideas,

al candidato a Dr. Rogelio Arteaga-Tlecuitl por su asesoría con los experimentos de mutagénesis sitio-dirigida y con la técnica de patch clamp,

a la M. en C. Ana Laura Sánchez-Sandoval por su asesoría con los experimentos de Western blot e invasividad,

al M. en C. Eduardo Chávez-Colorado por las discusiones académicas,

al Biol. Luis Montiel Reyes por su perseverancia en el estudio de los canales de calcio tipo T,

a la Sra. Lucía Vázquez Gutiérrez por tener siempre todo en perfectas condiciones para un trabajo armonioso en el laboratorio,

a la Sra. Teresa Constantino por su amabilidad gastronómica,

a la Unidad de Medicina Genómica del Hospital General de México,
a la Dra. Ana María Espinosa por su excelente asesoría con los experimentos realizados
en el Hospital General de México,
a la Dra. Ana Alfaro por su enorme apoyo académico y no académico en el Hospital
General de México,
a la Química América Gutiérrez Castro por su excelente asesoría en proteómica,
a los demás miembros de la Unidad: Elenita, Sra. Lupita, Jonathan, Luis Antonio,
Valeria, Ingrid, Mariano, Eligia, Maura, Mayte, Cinthia, Norma y Mabel por su
amabilidad,

al Departamento de Biología Celular del CINVESTAV Unidad Zacatenco,
al Dr. José Eduardo Pérez Salazar, por su excelente asesoría y su espacio experimental,
al Dr. Pedro Cortés Reynosa por sus asesorías y enseñanzas,

a la Unidad de Investigación *Nutrition, Croissance et Cancer* del Inserm UMR1069 de
la Facultad de Medicina de la Universidad de Tours, Francia,
al Dr. Sébastien Roger por todo su apoyo durante mi estancia académica en su
laboratorio,
al Dr. Pierre Besson por las discusiones académicas enriquecedoras,
a la Dra. Lucie Brisson por su excelente asesoría y disposición,
al Dr. Fabio Ferro por el intercambio de experiencias electrofisiológicas,
a la Dra. Driffa Moussata por su apoyo con las biopsias humanas del Hospital
Universitario Trousseau de Tours,
a la Dra. Isabel Domingo por su apoyo y asesoría en el laboratorio,
a los estudiantes de doctorado Frédéric Gradek, Lucile Poisson y Adelaide Doray por su
amigable apoyo y sus recomendaciones,
a Cléa Dziagwa y Charles Mureau por su confianza y entusiasmo en los proyectos
compartidos,

al Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM)
a la Dra. Adela Rodríguez-Romero por sus valiosas asesorías y el apoyo recibido
durante mi estancia académica en su laboratorio,

a Brisa Robles y Javier Gallegos por el apoyo bibliográfico durante todos estos años,
a mis hermanos Javier, Gerardo, Luciano, Caro, Gilberto, Felipe y Ana María por sus
enseñanzas y cariño,
a sus esposas Rocy, Lupita, Lety, Alicia, Dany y esposos José y Moy,
a mis sobrinos,

a mis queridos Joel, Tito, Viridiana, Oscar, Xanic, Cinthya, Jonathan A., Marisol T.,
Paty y Viridiana B., por su genuina amistad.

Comunicaciones orales

Este trabajo fue presentado en el 29th Ion Channel Meeting de la Asociación Francesa “Canaux Ioniques” Septiembre 9–12, 2018. Sète, Costa Mediterránea, Francia.

The invasiveness of human cervical cancer associated to the function of Nav1.6 channels is mediated by MMP-2 activity

Osbaldo Lopez-Charcas, Ana María Espinosa, Ana Alfaro, Zazil Herrera-Carrillo, Belen Ramirez-Cordero, Pedro Cortes-Reynosa, Eduardo Perez-Salazar, Jaime Berumen, Juan Carlos Gómora.

Tabla de contenido

RESUMEN	4
ABSTRACT	6
LISTA DE ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	8
ANTECEDENTES	18
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	23
MÉTODOS.....	24
Declaración de Ética.....	24
Biopsias Humanas.....	24
Extracción de RNA	25
RT-PCR en tiempo real (qPCR).....	27
Identificación de las variantes del gen <i>SCN8A</i> en el exón 18	28
Cultivos de líneas celulares de CaCu	29
Extracción de proteína y experimentos de Western Blot.....	30
Preparación de extractos de proteína citoplasmática y nuclear de líneas celulares de CaCu	32
Inmunohistoquímica.....	33
Inmunofluorescencia y Microscopía Confocal.....	34
Electrofisiología	35
Ensayos de invasividad.....	37
Ensayo de herida en monocapa	39
Ensayos de Proliferación	40
Zimografía	41
Análisis Estadísticos.....	42
RESULTADOS	43
La sobre expresión del gen <i>SCN8A</i> es una característica distintiva del cáncer cervicouterino invasivo	43
Análisis de la expresión de la proteína de los canales $\text{Na}_V1.6$ en la secuencia neoplasia-carcinoma del tejido de cérvix humano	49
Inmunodetección de la proteína de $\text{Nav}1.6$ en cortes histológicos del cérvix humano... 50	50
La mayoría de las células de cáncer cervicouterino no expresan corrientes de sodio activadas por voltaje en registros de patch clamp en célula completa.....	52
Expresión heteróloga de los canales $\text{Na}_V1.6$ incrementa la capacidad invasiva de las células de cáncer cervicouterino	60
La expresión funcional de los canales $\text{Na}_V1.6$ incrementa la secreción específica y actividad de la metaloproteinasa de matriz tipo 2	66
DISCUSIÓN	75
CONCLUSIONES	82
PERSPECTIVAS	83
REFERENCIAS	85
APÉNDICE	90

RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es el segundo cáncer femenino más frecuente a nivel mundial, afectando principalmente a países en desarrollo. La infección con el virus del papiloma humano (VPH) está asociada con más del 98% de los casos de CaCu. Nuestro grupo de trabajo reportó la expresión funcional de canales de sodio activados por voltaje (canales Nav) en CaCu, así como la contribución específica del canal Nav1.6 en la capacidad invasiva de células de CaCu positivas al tipo 16 del VPH. En el presente estudio demostramos que la sobre expresión del gen de Nav1.6 (*SCN8A*) es una desregulación general en el CaCu, independientemente del tipo de VPH oncogénico presente. En contraste, no se observaron diferencias en los niveles de expresión del gen *SCN8A* entre muestras de cérvix no canceroso (CNC) y de neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Interesantemente, el análisis de expresión de variantes del gen *SCN8A* del exón 18 en líneas celulares y biopsias cérvix, indicó que las células C33A, SiHa, CaSki y HeLa expresan principalmente la variante del gen *SCN8A* que carece del exón 18 y que ha sido descrita como una isoforma trunca de los canales Nav1.6 con una clara participación a nivel intracelular en otros tipos de cáncer. Por el contrario, las biopsias de CaCu expresaron consistentemente la variante adulta del exón 18 del *SCN8A*. Consecuentemente, experimentos de *patch-clamp* en célula completa realizados en las líneas celulares de CaCu demostraron la ausencia de corrientes de sodio activadas por voltaje (I_{Na}). La expresión heteróloga de canales Nav1.6 en las células de CaCu produjo I_{Na} robustas e incremento sustancialmente la capacidad invasiva mediante un aumento en la actividad de la metaloproteinasa de matriz tipo 2 (MMP-2). Los resultados sugieren que la desregulación del gen *SCN8A* ocurre principalmente cuando el tejido se ha transformado en cáncer y no en etapas pre-neoplásicas de la enfermedad. Asimismo, la invasividad mediada por los canales Nav1.6 en el CaCu involucra la actividad de la

MMP-2. Estos hallazgos contribuyen y refuerzan la noción del uso de los canales Nav como blancos terapéuticos contra el fenómeno metastásico del cáncer.

ABSTRACT

Voltage-gated sodium (Na_V) channels have been related with cell migration and invasiveness in human cancers. We previously reported the contribution of $\text{Nav}1.6$ channels activity with the invasion capacity of cervical cancer (CeCa) positive to Human Papilloma Virus type 16 (HPV16), which accounts for 50% of all CeCa cases. Here, we show that $\text{Nav}1.6$ gene (*SCN8A*) overexpression is a general characteristic of CeCa, regardless of the HPV type. In contrast, no differences were observed in $\text{Nav}1.6$ channel expression between samples of non-cancerous and cervical intraepithelial neoplasia. Additionally, we found that CeCa cell lines, C33A, SiHa, CaSki and HeLa, express mainly the splice variant of *SCN8A* that lacks exon 18, shown to encode for an intracellularly localized $\text{Nav}1.6$ channel, whereas the full-length adult form was present in CeCa biopsies. Correlatively, patch-clamp experiments showed no evidence of whole-cell sodium currents (I_{Na}) in CeCa cell lines. Heterologous expression of full-length $\text{Nav}1.6$ isoform in C33A cells produced I_{Na} , which were sufficient to significantly increase invasion capacity and matrix metalloproteinase type 2 (MMP-2) activity. These data suggest that upregulation of $\text{Nav}1.6$ channel expression occurs when cervical epithelium have been transformed into cancer cells, and that $\text{Nav}1.6$ -mediated invasiveness of CeCa cells involves MMP-2 activity. Thus, our findings support the notion about using Nav channels as therapeutic targets against cancer metastasis.

LISTA DE ABREVIATURAS

CaCu. Cáncer cervicouterino

CNC. Cérvix no-canceroso

NIC. Neoplasia intraepitelial cervical

VPH. Virus de papiloma humano

MMP. Metaloproteinasa de matriz

CaCu. Cáncer cervicouterino

SFB. Suero fetal bovino

ASB. Albúmina sérica bovina

TTX. Tetrodotoxina

PBS. Phosphate buffered saline, buffer fosfato salino

TRIS-HCl. Hidrocloruro de tris-(hidroximetil)-aminometano

IGEPAL. Octilfenoxi-poli-(etilenoxi) etanol

TBST. Buffer de TRIS suplementado con 1% del detergente Tween-20

h: horas

min: minutos

seg: segundos

INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es el segundo cáncer femenino más frecuente a nivel mundial con más de 500 mil nuevos casos y cerca de 250 mil muertes cada año, ocupando la tercera posición en mortalidad por cáncer en mujeres y principalmente en países en desarrollo [1]. El virus de papiloma humano (VPH) es el principal factor de riesgo para el desarrollo de este carcinoma y a la fecha han sido identificados más de un centenar de genotipos de VPH. Particularmente, los genotipos 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, 35, 59, 56, 51, 39, 68, 73 y 82 de VPH se han clasificado como de “alto riesgo” debido al potencial oncogénico que poseen, por lo que están asociados con la mayoría de los casos de cáncer cervicouterino [2]. El VPH tipo 16 (VPH16) es el más frecuente y contribuye con más del 50% del total de casos de CaCu, seguido por el VPH18 con un 17% y otros (VPH 45, 31, 33, 52, 58, 35, 59, 56, 51, 39, 68, 73 y 82) que en conjunto suman un 25% adicional a los casos de CaCu (**Fig. 1**). Aproximadamente, el 15% de los casos de CaCu son diagnosticados con enfermedad metastásica, caracterizada por la diseminación de células cancerosas provenientes del tumor primario localizado en el cuello uterino hacia ganglios linfáticos, vagina y recto; aunque en estados más avanzados de la enfermedad la diseminación también se presenta hacia pulmón, hígado y hueso. En cualquiera de los dos casos, la aparición de cáncer cervicouterino metastásico y su progresión limita enormemente el tratamiento y la supervivencia de los pacientes [3, 4]. A la fecha, el conocimiento de los detalles moleculares subyacentes acerca de la enfermedad metastásica es incompleta y no hay un tratamiento específico para prevenir o tratarla eficientemente. Por lo tanto, resulta prioritario encontrar nuevos marcadores moleculares con el fin de detectar el cáncer cervicouterino en los estadios más tempranos de la enfermedad, así como para usarlos en el tratamiento de la enfermedad metastásica.

El CaCu se genera por la progresión de una neoplasia intraepitelial cervical pre-invasiva (NIC), que histológicamente es clasificada como displasia leve (NIC-1), moderada (NIC-2) y severa (NIC-3). El CaCu se produce principalmente por la progresión de NIC-3 y NIC-2, pero muy rara vez por NIC-1; las tasas de progresión estimadas son 12%, 5% y 1%, respectivamente [5].

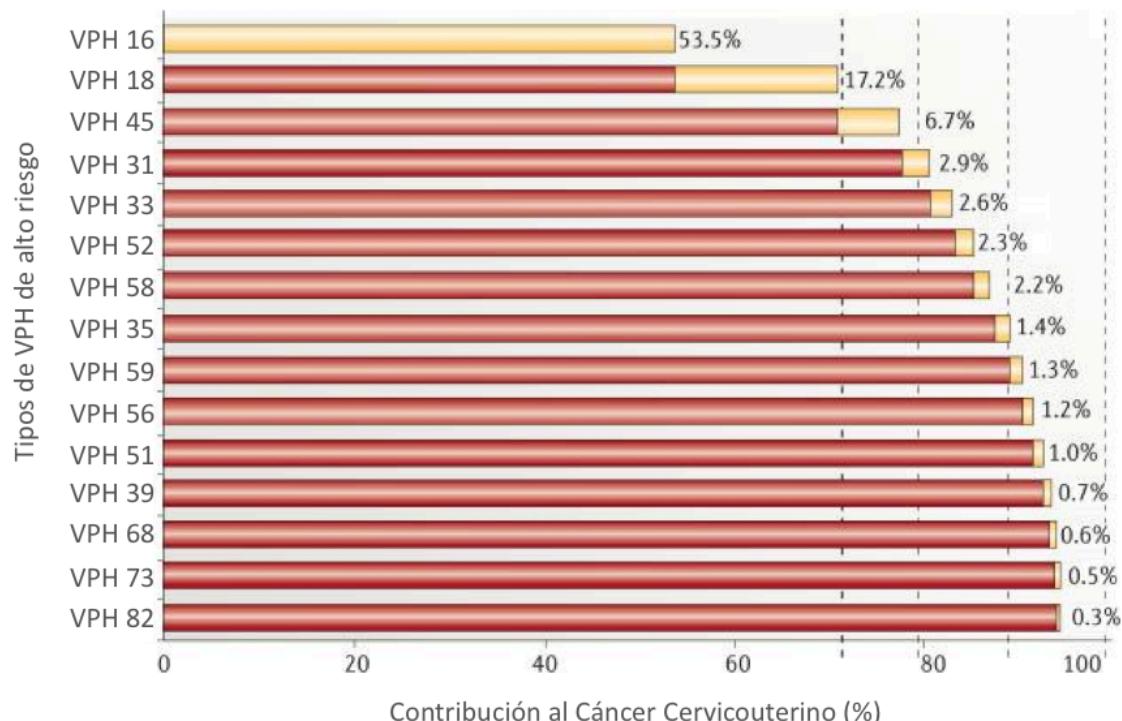


Figura 1. Virus de Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo y cáncer cervicouterino. La gráfica muestra los quince principales tipos de VPH considerados de alto riesgo debido a la capacidad oncogénica que presentan y el porcentaje de contribución al total de casos de CaCu. Note que el VPH tipo 16 es el responsable de más de la mitad del total de casos de este carcinoma (Modificada de [2]).

Desde el año 2006 se aprobó el uso de dos versiones de vacuna contra el virus del papiloma humano, una divalente contra los tipos de VPH (16 y 18), otra tetravalente contra los tipos de VPH (16, 18, 6 y 11) [6], y más recientemente, una vacuna nonavalente contra los tipos de VPH (16, 18, 6, 11, 31, 36, 45, 52 y 58). La administración de la vacuna a niñas antes de su primera relación sexual (9 a 13 años) previene las infecciones por VPH. Sin embargo, dicha medida preventiva no resuelve

por completo el problema de salud que representa el CaCu, ya que, en primera instancia deja fuera a la población de mujeres que actualmente tienen actividad sexual, es decir, mujeres mayores de 15 años, de las cuales cerca del 95% han transitado o transitarán con alguna infección por el VPH a lo largo de su vida [7]. Además, existe la posibilidad de un reemplazo de genotipo de VPH en CaCu, es decir, que alguno de los otros tipos de VPH oncogénicos existentes aprovechen el nicho ecológico disponible (por la vacunación limitada contra ciertos tipos de VPH) y el CaCu siga siendo promovido por otros tipos de VPH. Finalmente, dado que el pico de incidencia del CaCu ocurre en mujeres de 45 a 50 años de edad, el efecto de estos programas de vacunación preventiva sobre la reducción de la prevalencia del CaCu no se conocerá hasta dentro de 30 años. Adicionalmente, se estima un incremento global en la incidencia y mortalidad del cáncer cervicouterino si las mujeres que ya han sido vacunadas no son apropiadamente incluidas en los programas de detección temprana de CaCu [8]. Por lo anterior, resulta necesario el desarrollo de nuevas estrategias que permitan la detección certera y oportuna de este tipo de cáncer, así como para el tratamiento del CaCu en la fase metastásica.

El CaCu como otros tipos de cáncer es completamente curable si se diagnostica a tiempo. Durante muchos años, la prueba de Papanicolaou (Pap) ha sido el procedimiento de tamizaje más importante para la detección temprana del CaCu y su aplicación masiva en países desarrollados ha disminuido la incidencia de CaCu en más del 50% durante los últimos 40 años [9]. Mujeres con un Pap anormal son referidas a una colposcopia para confirmar, descartar o aclarar el diagnóstico con un estudio histopatológico. Sin embargo, el promedio de sensibilidad del Pap para la detección de

lesiones NIC es de 50-60%; aunque la especificidad es muy alta, aproximadamente del 90% [10].

La infección con el VPH es indispensable para el desarrollo del CaCu, por lo cual, durante la última década se ha incorporado la detección del genoma del VPH como un método de tamizaje para el CaCu. Comparado con el Pap, la prueba de DNA de VPH presenta una alta sensibilidad, pero su especificidad es baja en la detección de lesiones NIC-2/3. La baja especificidad de la prueba de DNA de VPH se ve reflejada en el incremento del número de pacientes en seguimiento, así como el incremento de pacientes referidos a una colposcopia, lo cual incrementa el costo del tamizaje en los sistemas de salud [11].

Por otra parte, el cáncer cervicouterino metastásico es debido principalmente a que las células cancerosas adquieren propiedades invasivas y una elevada resistencia a la quimioterapia. Respecto a las propiedades invasivas de las células cancerosas, es bien sabido que las proteasas de matriz extracelular, incluida la familia de las MMPs (*Matrix Metalloproteinases*) son fundamentales para el desarrollo de metástasis en el CaCu así como en otros tipos de cáncer de origen epitelial [12-14]. Las MMPs son definidas como endopeptidasas de la matriz extracelular y participan importantemente en diferentes procesos asociados al fenotipo celular canceroso tales como remodelamiento de la matriz extracelular, angiogénesis, apoptosis, transición epitelio-mesenquima, motilidad celular, etc. Las MMPs son miembros del grupo de proteasas denominadas *metzincin* debido a la unión del ion zinc y un residuo de metionina (Met) conservado en el sitio activo. Las MMPs de mamíferos comparten una estructura con dominio conservado (**Fig. 2**) que consiste de un dominio catalítico y un pro-dominio auto-inhibitorio. El pro-dominio presenta un residuo de cisteína (Cys) conservado que

coordina al ion Zn^{2+} en el sitio activo para inhibir la catálisis. Así, cuando el pro-dominio es desestabilizado o removido, el sitio activo está disponible para degradar a su respectivo substrato [15]. La mayoría de los miembros de la familia de las MMPs también contienen un dominio de hemopexin, unido al carboxilo terminal por una bisagra flexible. Dicho dominio es responsable de las interacciones proteína-proteína, así como del reconocimiento adecuado de substrato, activación de la enzima, internalización y degradación [16].

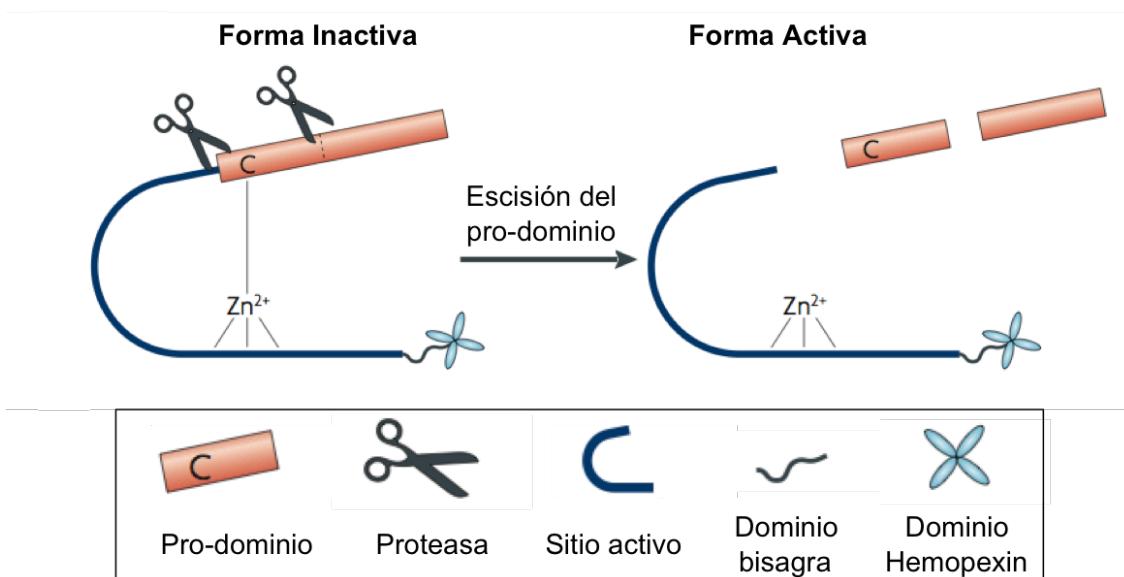


Figura 2. Estructura esquemática simplificada de las MMPs. Las metaloproteinasas de matriz son expresadas como pro-formas de la enzima. Un residuo conservado de cisteína en el pro-domínio coordina al ion zinc para mantener inactiva la actividad catalítica. El pro-domínio es removido por múltiples escisiones para dar lugar a la forma activa de la proteasa (Modificada de Page-McCaw et al. 2007).

Durante la carcinogénesis ocurren múltiples cambios a nivel molecular y celular que acumulados a lo largo del tiempo (meses e incluso décadas) dirigen un cambio fundamental en la identidad de una célula normal para convertirla en maligna [17]. Dichos cambios no solamente incluyen mutaciones en genes clave para el control del ciclo celular o el silenciamiento de genes supresores de tumores, sino también la expresión anómala de genes y proteínas que participan de manera no-canónica (con

nuevas funciones) favoreciendo el fenotipo canceroso de las células. Durante las últimas tres décadas ha sido identificada la expresión aberrante de diferentes tipos de canales iónicos en células derivadas de cánceres humanos así como su participación en etapas específicas de la progresión de esta enfermedad [18], convirtiéndose de este modo en prometedores blancos moleculares para la terapia dirigida contra el cáncer. Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana cuya función principal es el transporte de iones a través de la membrana plasmática de la célula y son responsables de funciones esenciales (no patológicas) tales como la proliferación, migración y excitabilidad celular, la secreción de hormonas y neurotransmisores, la expresión génica, el acople excitación-contracción, la comunicación intercelular, etc. [19]. Particularmente, los canales de sodio activados por voltaje (canales Nav) son funcionalmente expresados en varios tipos de cáncer de origen epitelial (mama, cérvix, colorrectal, gástrico, pulmón, próstata, ovario, etc.), así como en otros tipos de cáncer (glioma y leucemia), no obstante que dichos canales están pobremente expresados o incluso ausentes en los mismos tejidos en condiciones no cancerosas [20, 21]. Los canales Nav son complejos proteicos formados por una subunidad principal denominada α (alfa) asociada a una o dos subunidades auxiliares denominadas β (beta). En humanos existen 9 genes que codifican para subunidades α y 4 para subunidades β de los canales Nav y de acuerdo a la sensibilidad que presentan a la tetrodotoxina (TTX) se pueden clasificar como sensibles a la TTX (TTX-S), los cuales son bloqueados a concentraciones nanomolares de la toxina o como resistentes a la TTX (TTX-R) cuando requieren de concentraciones micromolares (**Fig. 3**). La subunidad α (aproximadamente de 2000 aminoácidos, ~220 kDa) consiste de cuatro dominios homólogos que forman un poro central conductor de iones rodeado por cuatro sensores de voltaje y cada uno de los cuatro dominios contiene

seis segmentos transmembranales llamados S1 a S6 interconectados por asas intra- y extracelulares [22] (**Fig. 4A**).

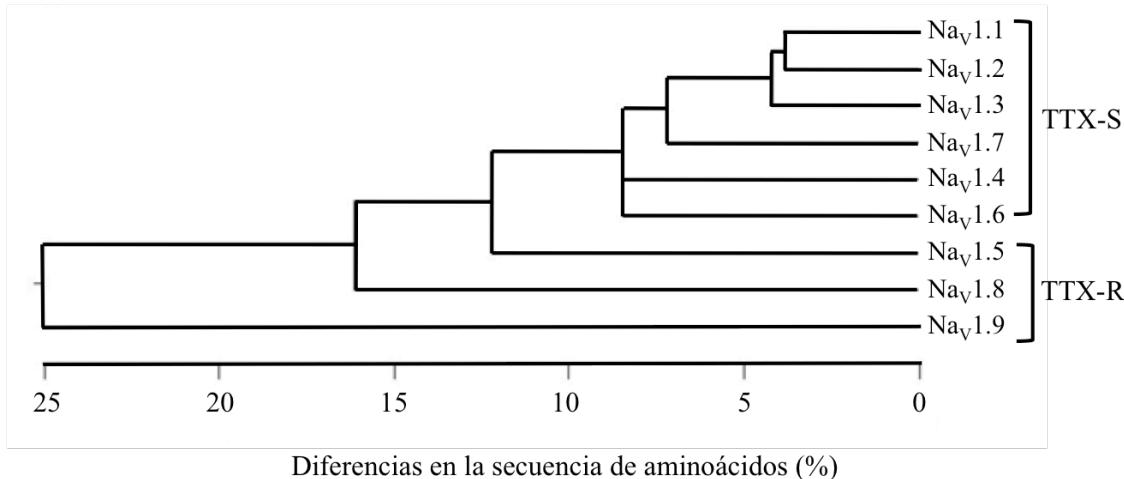


Figura 3. Árbol filogenético de las subunidades α de los canales Nav. Comparación de la identidad de aminoácidos entre los miembros de la familia de los canales Nav. El análisis incluyó los cuatro dominios de las subunidades α y el asa citoplasmática que une a los dominios III y IV. Los miembros de la familia de los canales Nav pueden clasificarse de acuerdo a su sensibilidad a la tetrodotoxina como sensibles (TTX-S) o resistentes (TTX-R) (Modificado de [23]).

Recientemente, mediante estudios de cristalografía de rayos X se logró dilucidar la estructura atómica de un canal de sodio de bacterias con una resolución de 2.7 Å [24] (**Fig. 4B**). Los resultados de este trascendental trabajo, así como los antecedentes previos sobre las similitudes entre los canales Nav de mamíferos y de bacterias [25], muestran que en los canales de sodio el extremo intracelular del poro está delineado por los segmentos S6 y el extremo opuesto está revestido por las asas que unen los segmentos S5 y S6 de cada dominio, tales asas, llamadas generalmente asas del poro, forman el vestíbulo externo del canal, el filtro de selectividad iónica, y contribuyen a su afinidad por diversas toxinas que modifican la actividad de la subunidad α [26].

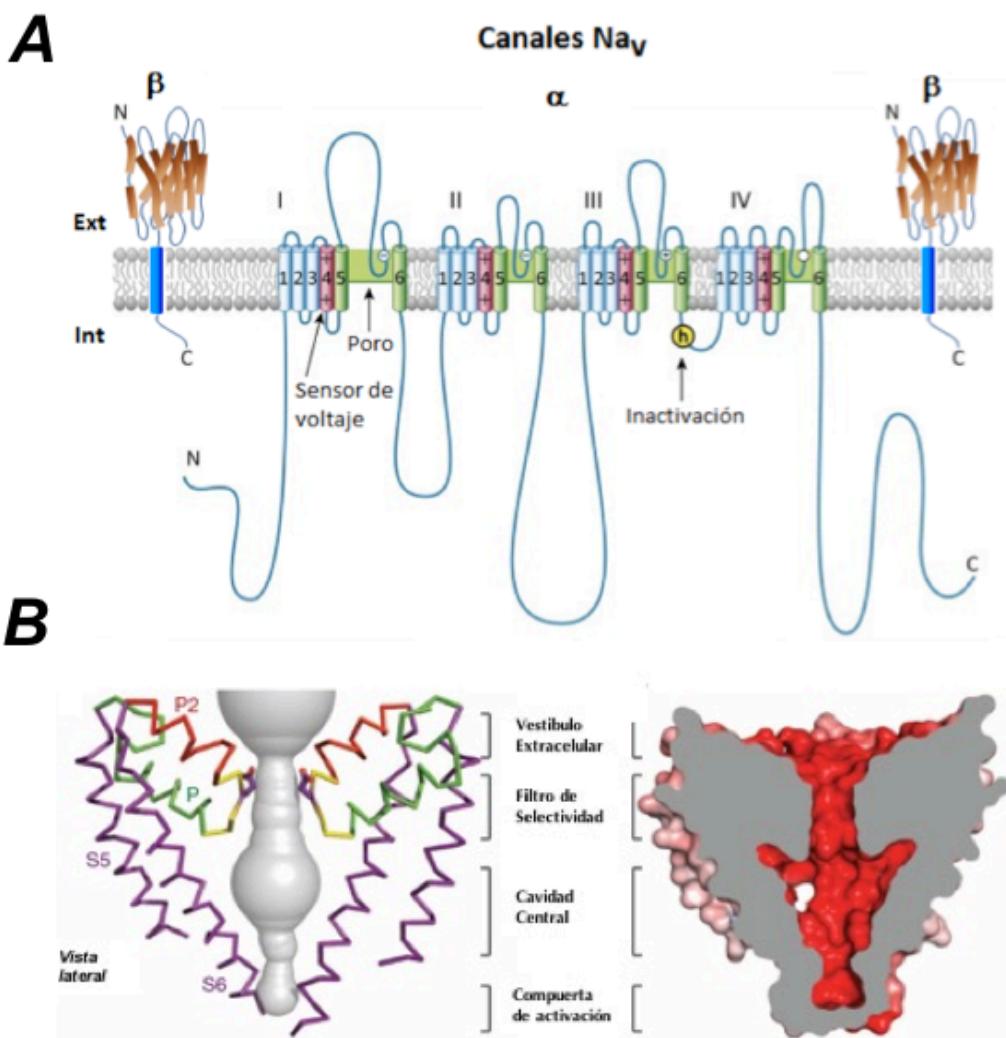


Figura 4. Topología estructural de los canales Na_v . **A**, La subunidad α de los canales Na_v está formada por un polipéptido que consiste de cuatro dominios (I a IV), cada uno de ellos a su vez consistente de seis segmentos transmembranales (S1 a S6). El segmento S4 de cada dominio contiene residuos de arginina con carga neta positiva, cuya función es detectar los cambios de voltaje transmembranal; por su parte el asa que une los dominios S5 y S6 forma el poro de selectividad a través del cual fluyen los iones Na^+ . Las subunidades β ($\beta_1\text{-}\beta_4$), son proteínas transmembranales con una región amino extracelular muy prominente parecida a las inmunoglobulinas que interactúa con la subunidad α de los canales Na_v modificando sus propiedades biofísicas y expresión en la membrana plasmática (Modificado de [27]). **B**, Vista lateral de la arquitectura del poro (izquierda) y potencial electrostático de superficie (derecha) del canal de sodio cristalizado de bacterias. En ambos paneles se observa el vestíbulo extracelular, el filtro de selectividad, la cavidad central del canal y la compuerta de activación. Se muestran las asas del poro (P y P2), así como los segmentos transmembranales S5 y S6 de uno de los dos dímeros que forman el canal completo de bacterias (Modificado de [24]).

Las subunidades accesorias β están involucradas en el tráfico de la subunidad α hacia la membrana plasmática, así como en la modulación de sus propiedades biofísicas. Además, las subunidades β interactúan con moléculas de adhesión celular, de la matriz extracelular y del citoesqueleto [28]. La función canónica de los canales Na_V es la generación y propagación del potencial de acción en células excitables [29]. Sin embargo, la expresión anormal de estas proteínas en células humanas malignas ha sido principalmente asociada con la invasividad celular y la progresión del cáncer [30-37]. La participación de los canales Na_V en las propiedades invasivas de las células de cáncer ha sido ampliamente estudiado en el cáncer de mama [38-41] y más recientemente en cáncer gástrico [37]. La subunidad formadora de poro de los canales $\text{Na}_V1.5$ se expresa funcionalmente en las células de cáncer de mama MDA-MB-231, las cuales presentan un fenotipo altamente agresivo. No obstante, la expresión de los canales $\text{Na}_V1.5$ en dichas células no está asociada con la generación de potenciales de acción; su función consiste en participar en la degradación de la matriz extracelular (MEC) por un incremento en la actividad del intercambiador Na^+/H^+ tipo 1 (NHE-1) [38, 39]. Tal aumento promueve la activación consecutiva de las proteasas extracelulares acídicas del tipo cisteína-catepsina y la modificación de la polimerización de la F-actina a través de la actividad de la cinasa Src, con lo que las células adquieren un fenotipo agresivo, manifestado por incrementar la invasividad celular [38-40]. Adicionalmente, la pérdida del gen *SCN4B* (gen que codifica para la subunidad $\text{Na}_V\beta 4$) en células humanas de cáncer de mama promueve la adquisición de un fenotipo híbrido ameboide-mesenquimal, asociado con la capacidad metastásica de las células, mientras que la sobre expresión de $\text{Na}_V\beta 4$ reduce la invasividad celular del cáncer [42]. Lo anterior sugiere nuevas funciones no canónicas de las subunidades auxiliares $\text{Na}_V\beta$ adicionales a aquellas mostradas por las subunidades- α formadoras de poro de los canales Na_V .

Además, un estudio reciente muestra que los canales Nav1.7 codificados por el gen *SCN9A* es abundantemente expresado en el cáncer gástrico humano, donde su actividad induce un incremento en la expresión del transportador NHE-1, un aumento en la proliferación e invasividad celular, así como un incremento en la expresión de la oncoproteína *metastasis-associated in colon cancer* (MACC1) [37].

Por otra parte, el canal de sodio Nav1.6 (codificado por el gen *SCN8A*) se ha encontrado expresado en macrófagos derivados de leucemia monocítica humana y células malignas derivadas de melanoma humano. En estos casos el canal Nav1.6 se expresa exclusivamente en vesículas intracelulares, y se demostró que estos canales contribuyen a la invasividad celular a través de su participación en la formación del podosoma e invadopodio (elementos estructurales requeridos para que una célula adquiera propiedades invasivas) mediante un mecanismo que involucra el movimiento intracelular de iones sodio y calcio, así como la reorganización de la F-actina del citoesqueleto [43].

ANTECEDENTES

En los últimos años nuestro grupo de trabajo ha reportado la expresión funcional de canales Nav sensibles a la TTX en cultivos primarios y biopsias de CaCu positivos para el VPH tipo 16 (**Fig. 5**) [44].

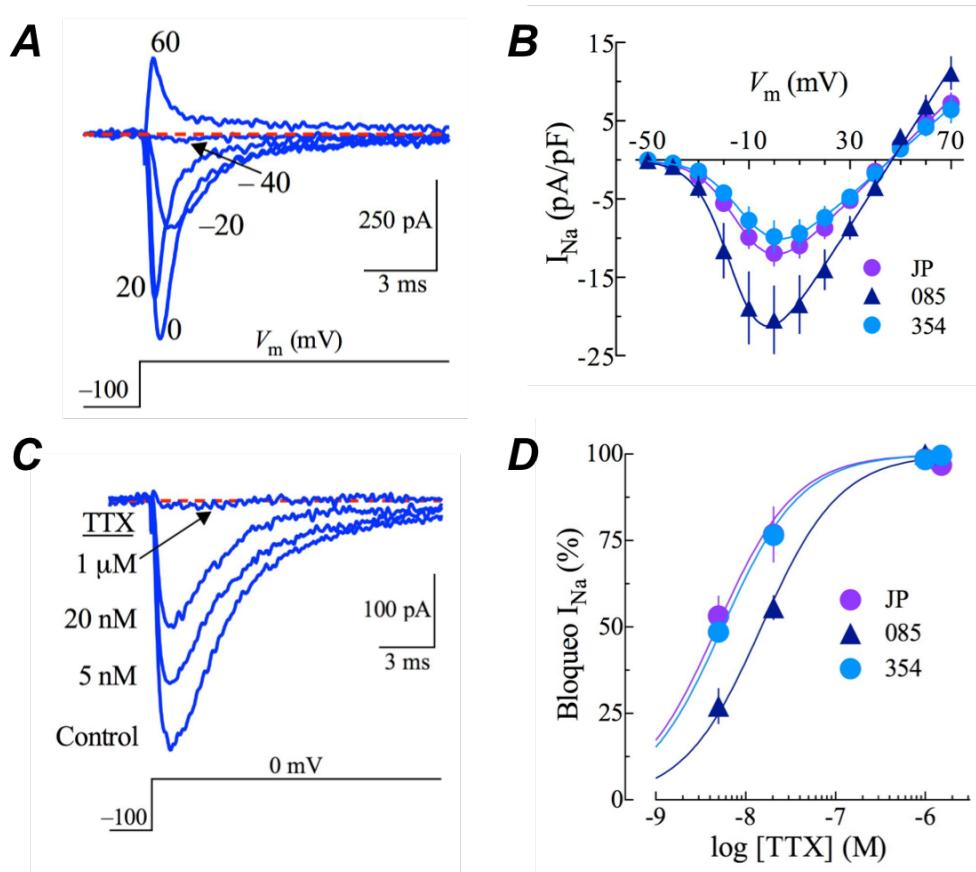


Figura 5. Expresión funcional de los canales Nav en CaCu positivo a VPH16. **A**, Familias de corrientes de sodio representativas obtenidas a partir de células de cultivos primarios de CaCu positivos para VPH16 en respuesta a pulsos despolarizantes de 16 ms de duración a diferentes potenciales de membrana, desde -80 hasta +60 mV, a partir de un potencial de mantenimiento de -100 mV. **B**, Relación corriente-voltaje ($I-V$) para los canales de sodio expresados en los cultivos primarios JP, 085 y 354 de CaCu positivo para VPH16. **C, D**, La caracterización farmacológica de las corrientes de sodio registradas en los cultivos primarios de CaCu demuestra que son generadas por canales Nav sensibles a la TTX (Modificada de [44]).

Resultados posteriores mostraron que entre todos los miembros de la familia de los Nav, el canal Nav1.6 es específicamente sobreexpresado y tiene una contribución directa a la capacidad invasiva de las células del CaCu (**Fig. 6**).

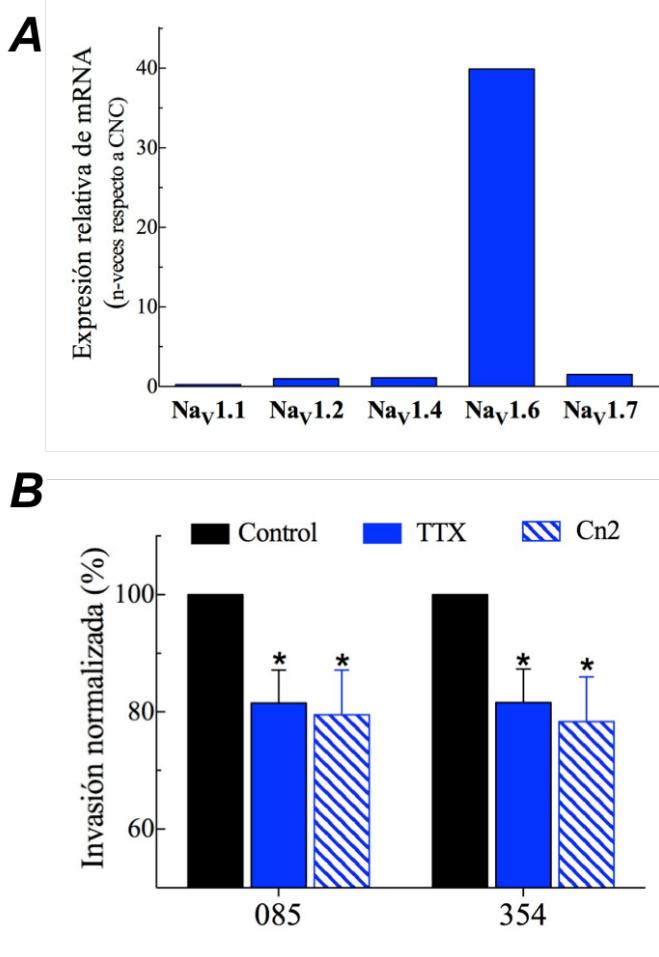


Figura 6. Sobre expresión de los canales $\text{Na}_v1.6$ en CaCu positivo a VPH16. *A*, Expresión relativa de los niveles de mRNA para los miembros TTX-S de los canales Na_v en CaCu positivo para VPH16 respecto al cérvix no canceroso. La subunidad $\text{Na}_v1.6$ es principalmente sobreexpresada en el CaCu positivo a VPH16. *B*, Los canales $\text{Na}_v1.6$ contribuyen a la invasividad celular *in vitro* del CaCu. Note que el uso de TTX, un bloqueador no selectivo de los canales Na_v , o el uso de la toxina Cn2, un bloqueador específico para los canales $\text{Na}_v1.6$, disminuyen en la misma magnitud la invasividad celular de células primarias derivadas de CaCu (cultivos 085 y 354), sugiriendo que los canales $\text{Na}_v1.6$ (sobre otros miembros de la familia Na_v) participan activamente en la capacidad invasiva de las células de CaCu positivas a VPH16 (Modificado de [45]).

Además, la expresión de la proteína de $\text{Na}_v1.6$ mostró una distribución subcelular distinta en las células de cáncer comparada con células no cancerosas, sugiriendo una reubicación asociada al cáncer de la proteína de los canales $\text{Na}_v1.6$ (Fig. 7) [44, 45].

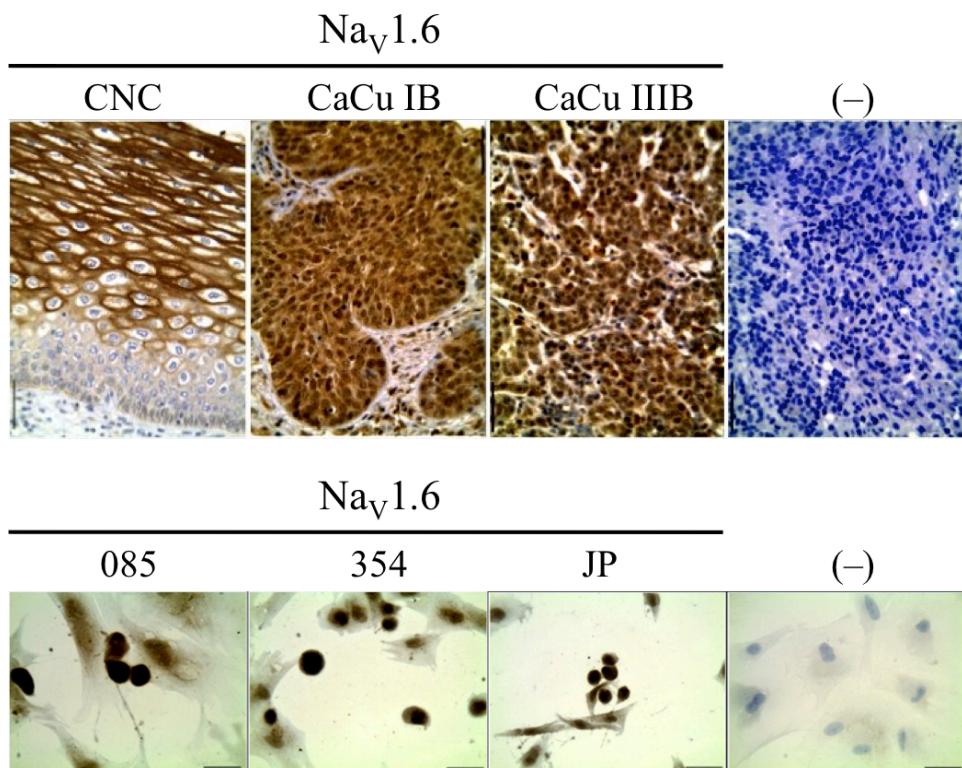


Figura 7. Distribución diferencial de la proteína de los canales Na_v1.6 en CaCu positivo a VPH16. Inmunodetección de los canales Na_v1.6 en tejido de cérvix humano y en células primarias derivadas de CaCu. Resultados de inmunohistoquímica convencional para la proteína del Na_v1.6 (señal café) en cérvix no canceroso (CNC), dos diferentes grados de CaCu (IB y IIIB) y tres cultivos primarios derivados de CaCu (085, 354 y JP). Note que la señal correspondiente al canal Na_v1.6 está definidamente localizada en la membrana plasmática de las células del epitelio estratificado del CNC. Por el contrario, en las muestras de CaCu (tejido y células primarias) la proteína del Na_v1.6 está distribuida no sólo en la membrana plasmática sino también al interior de las células (Modificada de [45]).

No obstante, se desconoce si la sobre expresión del canal Na_v1.6 es un fenómeno generalizado en todos los casos de CaCu, es decir, si el canal Na_v1.6 también se sobre expresa en las biopsias de CaCu infectadas por el resto de los VPH considerados como de alto riesgo. Además, nada se sabe acerca de la expresión de canales Na_v1.6 en la secuencia neoplasia-carcinoma del CaCu, es decir, cuáles son los niveles de expresión de ésta proteína en los diferentes estados fisiológico/patológico del tejido de cérvix humano, desde un cérvix sano, pasando por las lesiones preneoplásicas de bajo (NIC-1) y alto grado (NIC2/3) hasta el CaCu invasivo. Tampoco existe información acerca del

mecanismo involucrado en la invasividad celular del CaCu mediada por los canales Nav1.6. Por lo anterior, el presente trabajo doctoral consistió en incrementar las evidencias científicas y contribuir al entendimiento de la participación de los canales Nav1.6 en el cáncer cervicouterino humano.

HIPÓTESIS

1. La sobre expresión del gen *SCN8A* (Nav1.6) en muestras de CaCu es independiente del tipo de VPH oncogénico presente.
2. El gen *SCN8A* (Nav1.6) es sobre expresado en las muestras de lesiones preneoplásicas de alto grado (NIC-2/3) respecto al CNC.
3. Los niveles de expresión del gen *SCN8A* (Nav1.6) permitirán discriminar entre muestras de CaCu positivas a VPH oncogénicos y muestras de cérvix no canceroso (CNC).
4. La abundancia y distribución de la proteína del canal Nav1.6 en los casos de CaCu positivos para VPH oncogénicos es diferente respecto a las muestras de CNC.
5. La capacidad invasiva de las células de CaCu asociada a la expresión y actividad de los canales Nav1.6 involucra la participación de las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs).

OBJETIVOS

1. Cuantificar la abundancia relativa del gen *SCN8A* (Nav1.6) en biopsias de CaCu positivo a VPH oncogénicos, así como en biopsias de lesiones preneoplásicas de bajo (NIC-1) y alto grado (NIC2/3) y en muestras de CNC.
2. Determinar la especificidad y sensibilidad del uso de los niveles de expresión del gen *SCN8A* (Nav1.6) para discriminar entre casos de CaCu y CNC.
3. Caracterizar la distribución de la proteína de Nav1.6 en biopsias de CaCu positivas a VPH oncogénicos y en muestras de CNC.
4. Evaluar la participación de los canales Nav1.6 en la capacidad invasiva de células de CaCu y su relación con la actividad de las metaloproteinasas de matriz.

MÉTODOS

Declaración de Ética

El presente protocolo de estudio fue aprobado por los Comités de Ética y Científico del Hospital General de México (número de aprobación DIC/03/311/04/051) y fue realizado de acuerdo a los principios éticos descritos en la declaración de Helsinki de 1964. El consentimiento escrito e informado fue obtenido de todos los participantes antes de su inclusión en este estudio

Biopsias Humanas

Los sujetos de estudio incluyen 57 pacientes con cáncer cervicouterino invasivo (37 positivos a VPH16 y 22 positivos a otros tipos de virus, incluidos el VPH18, 31, 45, 52, 58, 59 y 68) diagnosticado en el Departamento de Oncología, 26 pacientes con lesión preneoplásica de bajo grado (NIC-1), 17 pacientes con lesión preneoplásica de alto grado (NIC-2 y NIC-3) y 19 pacientes con epitelio de cérvix normal (**Tabla 1**) evaluados en el Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital General de México, en la Ciudad de México. Todos los pacientes con CaCu cumplieron con el criterio de inclusión restrictivo (sin tratamiento previo, caso incidente, nacidos en México). El promedio de edad de los pacientes fue de 48 años (con intervalo, 23-78 años). Todos los pacientes recibieron evaluación clínica completa y después de la toma de la biopsia fueron referidos a cirugía, radioterapia, quimioterapia o combinación de estos tratamientos de acuerdo a la Sociedad Americana del Cáncer. Una o dos biopsias del tumor fueron tomadas durante la colposcopía, con parte de este tejido se realizó el análisis morfológico y el resto fue almacenado a -80° C hasta su análisis. Las muestras de epitelio de cérvix normal fueron obtenidas a partir de pacientes sometidas a

histerectomía como tratamiento de la miomatosis uterina en el Servicio de Ginecología del Hospital General de México. Previo a la recolección de estas muestras, el diagnóstico de cérvix normal fue realizado mediante citología y colposcopía. Para la detección y tipificación de VPH, un raspado del endo y ectocérvix fue colectado con ayuda de un cepillo citológico de las pacientes de CaCu y aquellas con epitelio normal, las células fueron suspendidas en un vial con buffer de extracción y almacenadas a -20°C hasta su análisis.

Tabla 1. Biopsias de tejido de cérvix humano empleadas en el presente estudio.

Tipo de Muestra	N	Tipo de VPH	Edad (años)
Cérvix no canceroso (CNC)	19	Negativo	46 (35-68)
Neoplasia intraepitelial cervical de bajo grado (NIC-1)	26	VPH16 (51%) VPH* (49%)	36 (19-56)
Neoplasia cervical intraepitelial de alto grado (NIC-2/3)	17	VPH16 (52%) VPH* (48%)	40 (20-79)
Cáncer cervicouterino (CaCu)	57	VPH16 (<i>n</i> =35) VPH* (<i>n</i> =22)	48 (23-78)

VPH* incluye a los tipos 18, 31, 45, 52, 58, 59 y 68.

Extracción de RNA

Las biopsias de cérvix humano fueron quirúrgicamente removidas usando unas pinzas Schubert. Cada biopsia se colocó inmediatamente en solución de Hank a 4°C suplementada con 2 mM de glutamina, penicilina (50 U/ml), y estreptomicina (50 µg/ml). Las biopsias fueron transportadas a 4°C hasta el laboratorio para su procesamiento. Cada muestra de tejido fue transferida a una caja Petri para remover y descartar las áreas con presencia de necrosis. El tejido fue cortado en pequeños fragmentos que fueron transferidos a un mortero contenido nitrógeno líquido, el

tejido fue triturado vigorosamente hasta obtener un polvo homogéneo. Finalmente, 2 ml del reactivo TRIzol (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA) fueron agregados al tejido pulverizado y el RNA total fue aislado de acuerdo al protocolo del fabricante. El RNA total de líneas celulares de CaCu fue aislado con el mismo reactivo, pero usando el protocolo para células adherentes. Después del aislamiento del RNA total, las fracciones orgánica fenol-cloroformo, así como la interfase fueron almacenadas para el aislamiento posterior de proteína total. La integridad del RNA fue confirmada mediante electroforesis en geles de agarosa mediante la presencia de las bandas ribosomales 18S y 28S (**Fig. 8**), el rendimiento y pureza del RNA aislado fueron determinados mediante espectrofotometría.

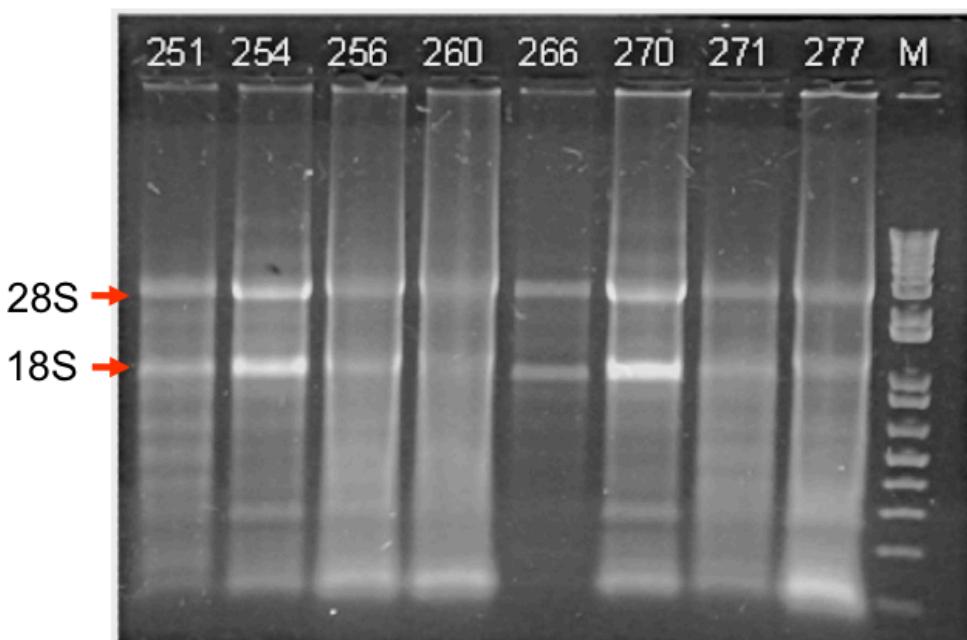


Figura 8. Imagen representativa de muestras de RNA obtenidas a partir de biopsias humanas de cuello uterino. El RNA total extraído del tejido humano fue sometido a una separación electroforética en geles de agarosa al 1%. La integridad del RNA quedó manifestada por la presencia de las bandas ribosomales 18S y 28S señaladas en la imagen.

RT-PCR en tiempo real (qPCR)

La determinación cuantitativa de los niveles de expresión del gen de interés, así como los genes de referencia se realizó mediante RT-PCR en tiempo real (qPCR). Una muestra ($3 \mu\text{g}$) de RNA total fue usado para la síntesis de cDNA mediante transcripción inversa utilizando el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA), en un volumen final de $20 \mu\text{l}$ de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente, mediante el empleo de sondas *TaqMan®* (Applied Biosystems), se determinó la abundancia relativa del gen *SCN8A* (Nav1.6) en cada muestra, así como la de los genes constitutivos 18S, GAPDH y HPRT1, que se usaron como controles endógenos. Los experimentos fueron realizados en triplicado utilizando un volumen final de $20 \mu\text{l}$, los cuales incluyeron 200 ng de cDNA molde, $10 \mu\text{l}$ de $2\times$ TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), $1 \mu\text{l}$ de sonda TaqMan específica para *SCN8A* y $7 \mu\text{l}$ de agua. Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo empleando un termociclador Rotor-*Gene 6000* (Qiagen, Hilden, Alemania) con las siguientes condiciones: una etapa de activación a 50°C durante 2 min seguida de 10 min a 95°C , después 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 segundos y alineamiento/extensión a 60°C durante 1 min. Curvas estándar relativas para cada gen fueron construidas usando diluciones seriadas de una reserva de cDNA de tejido cervical humano en un intervalo de 500-0.05 nanogramos (**Fig. 9**). La expresión del gen *SCN8A* fue normalizada en cada muestra con la expresión del gen interno y los niveles de expresión relativa fueron calculados el método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito originalmente por Livak y Schmittgen en 2001 [46].

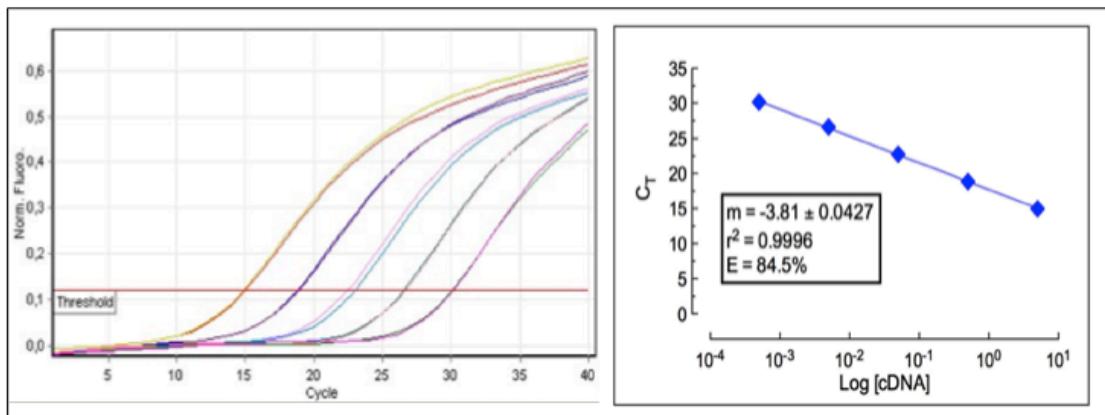


Figura 9. Ejemplo representativo de una curva estándar de qPCR para el gen 18S en muestras de CaCu positivas a VPH oncogénicos. A partir de un grupo de muestras de cDNA de CaCu se realizaron diluciones seriales cubriendo el intervalo de 500-0.05ng. Con cada dilución se realizaron las reacciones de qPCR empleando *primers* y sondas TaqMan específicas para el gen 18S. La gráfica muestra los valores de C_T en función del logaritmo de la concentración inicial de cDNA. Los datos experimentales fueron ajustados con una función lineal, los parámetros de la regresión lineal son mostrados en el recuadro de la figura. Una curva estándar confiable es aquella cuyo valor de r^2 es muy cercano a la unidad de acuerdo al trabajo original de Livak y Schmittgen [46].

Identificación de las variantes del gen *SCN8A* en el exón 18

Alícuotas de 3 μ g de RNA total proveniente de biopsias de cérvix humano fueron empleados para la síntesis de cDNA en un volumen final de 20 μ l usando el kit *High-Capacity* (Applied Biosystems) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se usaron 250 ng de cDNA molde en reacciones de PCR de 10 μ l a una concentración final de 200 μ M de dNTPs, 0.3 μ M de oligonucleótidos para el exón 18 del gen *SCN8A* (**Tabla 2**), 1.5 mM de MgCl₂, y 1.3 unidades de una mezcla de DNA polimerasas (*Expand High Fidelity PCR System*, Roche Diagnostics; Mannheim, Alemania). La reacción de PCR (35 ciclos) fue iniciada por un paso de denaturalización de 2 min a 95°C seguido por 45 seg a 95°C, y alineamiento/extensión, 30 seg a 60°C y 30 seg a 72°C. Un paso de extensión final de 4 min a 72°C fue incluido. Los productos de PCR de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A* fueron separadas por electroforesis en geles de agarosa al 2% y visualizadas bajo excitación con luz ultravioleta usando bromuro de etidio. La identidad

de cada variante del exón 18 del gen *SCN8A* fue confirmada por secuenciación automática.

Tabla 2. Información de oligonucleótidos empleados en RT-PCR estándar y qPCR.

Gen	Secuencia de oligonucleótido (5'→3')	Tamaño del producto (pb)
<i>SCN8A</i>	F: GGGATCCATGGAACTGGTTAGATT R: GCTCGGAGAACCTGAATGTT P: CCCAGGTCCACAAACT	109
Variantes del exón 18 de <i>SCN8A</i>	F: AAGTGGACAGCCTATGGCTTCG R: TGTTGACATCTTCAATTCAAATCGG	18A: 367 18N: 314 Δ18: 244

F: oligonucleótido en sentido; R: oligonucleótido en antisentido; P: Sonda TaqMan; 18A, 18N y Δ18, variantes adulta, neonatal y delta del exón 18 del gen *SCN8A*.

Cultivos de líneas celulares de CaCu

Las líneas celulares de cáncer cervicouterino humano fueron obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC; Manassas, VA, EUA) para estudiar aspectos mecanisticos en el presente estudio. Células HeLa (positivo a VPH18), SiHa y CaSki (positivo a VPH16) y C33A (negativo a VPH) fueron usadas como modelos de cáncer cervicouterino mientras que células HEK-293 ordinarias y HEK-293 que expresan establemente el canal Nav1.6 humano (HEK-Na_v1.6) fueron empleadas como modelos no-cancerosos. Todas las líneas celulares fueron crecidas y mantenidas en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM de L-glutamina y 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco-Thermo Fisher Scientific) a 37°C, 5% de CO₂ y una atmósfera saturada de agua.

Extracción de proteína y experimentos de Western blot

Los extractos de proteína total de tejido de cérvix humano fueron obtenidos a partir de las fases remanentes (interfase y fase orgánica fenol-cloroformo) después de la extracción de RNA con el reactivo TRIzol de acuerdo al protocolo correspondiente. La integridad de las proteínas totales fue verificada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción con azul de Coomassie (**Fig. 10**). Por otra parte, para obtener extractos de proteína total a partir de las líneas celulares de CaCu, los cultivos celulares al 85% de confluencia crecidos en cajas Petri de 100 mm fueron lavados dos veces con PBS y lisados usando un buffer de lisis con la siguiente composición: 25 mM TRIS-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% IGEPAL, 1% de deoxicolato de sodio y 1% de dodecil sulfato de sodio, conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasa (Roche Diagnostics). Los lisados celulares fueron sometidos a ondas mecánicas de alta frecuencia usando un baño de ultrasonido digital (Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, EUA); en total, se aplicaron 4 ráfagas de corta duración (10 seg) separadas por 1 min de incubación en hielo para obtener extractos homogéneos de proteína total. La integridad de las proteínas fue verificada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% seguida de una tinción con azul de Coomassie. La concentración de proteína fue cuantificada mediante el método espectrofotométrico de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) usando albúmina sérica bovina ultrapura como estándar de calibración. Para los experimentos de Western blot, 20 μ g de homogenados de proteína total fueron incubados bajo condiciones reductoras a 75°C durante 3 min y sometidos a separación electroforética en geles de poliacrilamida al 8%.

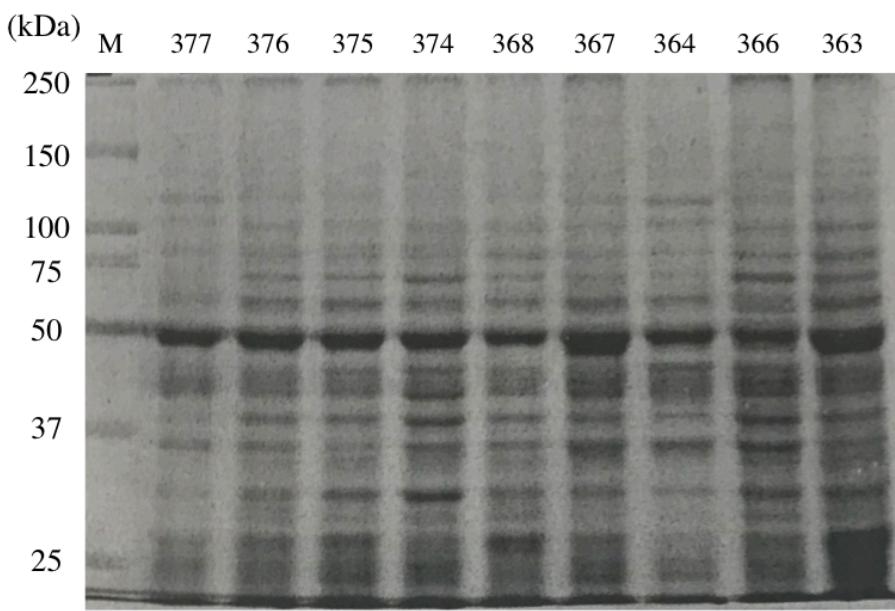


Figura 10. Verificación de la integridad de las proteínas de los extractos totales provenientes del tejido de cérvix humano. Separación electroforética en geles de poliacrilamida al 8% de 20 µg de proteína total de las muestras indicadas. Después de la electroforesis los geles fueron teñidos con una solución de azul de Coomassie y digitalizados. Note la presencia e integridad de una amplia gama de proteínas de distinto peso molecular.

Las proteínas fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (Millipore, Burlington, MA, EUA). Las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche libre de grasa (Bio-Rad) diluida en buffer TBST (100 mM TRIS, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) durante 3 h. Los anticuerpos primarios fueron utilizados a las siguientes diluciones: anti-Na_v1.6, 1:5000 (ASC-009; Alomone Labs, Israel); anti-GAPDH, 1:1000 (GTX100118; GeneTex; Irvine, CA, EUA); anti-HSC70, 1:1000 (SC-7298; Santa Cruz Biotechnology; Dallas, TX, EUA); anti-Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX), 1:1000 (GTX80928; GeneTex); anti-Histone-3, 1:1000 (GTX122148; GeneTex); anti-MMP2, 1:1000 (GTX104577; GeneTex); anti-MMP9, 1:1000 (GTX100458; GeneTex); anti-proMMP2, 1:1000 (AB37150; Abcam, Cambridge, RU) and anti-NHE-1, 1:800 (GTX85046; GeneTex). Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios durante 12 h a 4°C en agitación constante. Posteriormente, las membranas fueron sometidas a 3 lavados de 15 min cada uno usando buffer TBST e incubadas con los

correspondientes anticuerpos secundarios a una dilución de 1:10000 durante una hora, a temperatura ambiente y en agitación constante. Después de tres lavados adicionales con buffer TBST para remover uniones inespecíficas de los anticuerpos secundarios, las membranas fueron incubadas en el reactivo-substrato de electroquimioluminiscencia West Pico (Thermo Fisher Scientific) durante 5 min y las señales luminosas emitidas y correspondientes a cada proteína de estudio fueron capturadas en películas radiográficas a diferentes tiempos de exposición. Las imágenes obtenidas fueron digitalizadas en alta resolución y el estudio densitométrico de cada banda proteica fue realizado usando la herramienta analizador de geles del programa Fiji.

Preparación de extractos de proteína citoplasmática y nuclear de líneas celulares de CaCu

Las líneas celulares de CaCu fueron crecidas en cajas Petri de 100 mm bajo condiciones estándar hasta alcanzar una confluencia del 85%. Las monocapas celulares fueron lavadas dos veces con PBS y lisadas con 200 µl de buffer de enriquecimiento citoplasmático (10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 10 mM NaCl, 6 mM MgCl₂, 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM DTT, and 1 mM PMSF), agitadas por 5 min a 4°C y centrifugadas a 2600 rpm durante 15 min a 4°C. Los sobrenadantes fueron recuperados y etiquetados como fracción citoplasmática. Por otra parte, las pastillas celulares fueron lavadas dos veces con PBS a 4°C, resuspendidas en 40 µl de buffer de enriquecimiento nuclear (20 mM HEPES, pH 7.9; 420 mM NaCl, 20% glycerol, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF) y agitadas en un vortex durante 15 min a 4°C. Finalmente los extractos nucleares fueron recuperados por centrifugación a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C.

Inmunohistoquímica

La expresión de la proteína de los canales $\text{Na}_V1.6$ en los tejidos de cérvix humano fue realizada por un procedimiento de inmunohistoquímica convencional. Microarreglos de tejido (MAT) de cérvix fueron preparados en la Unidad de Medicina Genómica del Hospital General de México, cada arreglo incluyó muestras de cérvix no canceroso, neoplasia intraepitelial de bajo y alto grado, y cáncer cervicouterino. Los tejidos embebidos en parafina fueron sometidos a un calentamiento a 60°C durante 5 min seguido de inmersiones subsecuentes en los siguientes solventes: xileno absoluto, xileno-etanol (1:1), etanol absoluto, etanol 90%, etanol 70%, y agua, con la finalidad de remover la parafina y rehidratar el tejido. La recuperación antigénica fue realizada usando un buffer Tris/EDTA pH 9.0 (Dako, PT-link, Dako; Santa Clara, CA, EUA) a 115°C durante 5 min. La actividad endógena de la peroxidasa fue bloqueada usando una mezcla de substratos comerciales (Dako, REAL, Dako). Los tejidos fueron incubados con el anticuerpo primario anti- $\text{Na}_V1.6$ (1:150) (ASC-009; Alomone Labs) durante 15 h a 4°C en cámara húmeda. Después de tres lavados con buffer TBST los tejidos fueron incubados con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, la reacción inmunológica fue revelada por la oxidación de una solución de 3-3'-diaminobencidina (Dako, PT-link, Dako) durante 5 min. La reacción positiva fue identificada por la aparición de un compuesto café e insoluble producto de la acción oxidante de la peroxidasa. Para esta serie de experimentos, los controles negativos fueron obtenidos usando un inmunoglobulina irrelevante en lugar del anticuerpo primario anti- $\text{Na}_V1.6$. Después de la inmunodetección el tejido fue contrastado mediante una tinción estándar con hematoxilina y sometidos a un proceso de deshidratación rápida. Microfotografías de las preparaciones fueron adquiridas usando un microscopio de luz transmitida Leica

ICC50 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y almacenadas como imágenes de alta resolución para su documentación y posterior análisis. Con la finalidad de mostrar los resultados de acuerdo a la intensidad (producto formado) de la señal, la cual está asociada a la expresión de Nav1.6, se usó una escala cualitativa de señal como negativa (-), débil (+) o fuerte (++) .

Inmunofluorescencia y Microscopía Confocal

Para los experimentos de inmunofluorescencia en líneas celulares de cáncer de cérvix, 5000 células fueron sembradas en cajas Petri de 35 mm con fondo de cristal (Ibidi, Munich, Alemania). Las células fueron incubadas bajo condiciones estándar durante 24 h. El medio de cultivo fue retirado y las monocapas celulares fueron lavadas dos veces con PBS y fijadas con 3.7% de paraformaldehído en PBS a 4°C. Las preparaciones fueron permeabilizadas usando un buffer estándar con la siguiente composición (100 mM Glicina, 1% ASB y 0.2% Tritón X-100) durante 30 min en agitación y a temperatura ambiente. Las preparaciones fueron lavadas tres veces durante 5 min en agitación usando PBS. El bloqueo de epítopos no-específicos se realizó utilizando una solución de bloqueo que contenía 300 mM glicina, 3% ASB y 0.2% Tritón X-100 durante una hora, a temperatura ambiente y en continua agitación. El anticuerpo primario fue diluido en PBS suplementado con 10% de SFB y 0.2% de Tritón X-100 e incubado a 4°C durante 15 h. El exceso de anticuerpo primario y aquel unido inespecíficamente fue removido mediante tres lavados con PBS de 10 min cada uno. Un anticuerpo secundario acoplado al derivado de la fluoresceína (FITC) fue diluido en PBS suplementado con 10% de SFB y 0.2% de Tritón X-100 e incubado a temperatura ambiente durante una hora. Nuevamente, las preparaciones fueron lavadas tres veces con PBS y 10 min cada una. La tinción de los núcleos fue realizada incubando las

preparaciones con una solución de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, 5mg/ml) en PBS durante 2 min. Tres lavados finales con PBS fueron realizados para remover el exceso de DAPI. Para estos experimentos, los controles negativos fueron obtenidos mediante la pre-incubación del anticuerpo anti-Na_v1.6 con el péptido inmunogénico antes de usarlo sobre las muestras. Las preparaciones fueron observadas usando un microscopio confocal Zeiss LSM 800 con las líneas de láser ajustadas a 405 y 514 nm. Las imágenes fueron adquiridas usando el objetivo de inmersión 63×/1.4DIC con una excitación secuencial en diferentes planos focales con un espaciamiento en el eje z de 0.3 μm. Los parámetros de ganancia del detector y poder de láser fueron mantenidos constantes para todas las preparaciones.

Electrofisiología

Las células de cáncer de cérvix fueron co-transfectadas con los plásmidos que contienen al gen para Na_v1.6 y para la proteína verde fluorescente (GFP) usando el reactivo de transfección comercial JetPEI (Polyplus transfection™, Illrich, Francia) y de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Después de la transfección las células fueron cultivadas durante 36 h antes de los registros electrofisiológicos. Las células transfectadas fueron cosechadas y sembradas en cubreobjetos de vidrio contenidos dentro de cajas Petri de 35 mm. Las corrientes de sodio activadas por voltaje fueron exploradas entre 2 y 10 h después de sembrar las células. La actividad macroscópica de los canales Na_v1.6 fue examinada usando la técnica de *patch-clamp* en la configuración de célula completa (**Fig. 11**). Las corrientes de sodio fueron obtenidas a 21°C usando el amplificador Axopatch 200B, un convertidor A/D Digidata 1322A y el programa de adquisición de datos pCLAMP 9.4 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA. EUA). Las corrientes de sodio fueron digitalizadas de 10 a 20 kHz, después de un filtrado analógico de 5 kHz. La

resistencia en serie de célula completa y la capacitancia celular fueron estimadas a partir de la óptima cancelación de los transitorios capacitivos usando la herramienta de parámetros de *whole-cell* incluida en el amplificador y en algunos casos fue compensada eléctricamente en un 60-70%. Las células fueron sumergidas en solución externa de registro de la siguiente composición (en mM): 158 NaCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂ y 10 HEPES-NaOH (pH 7.4). La solución interna de registro con la siguiente composición (en mM): 106 CsCl, 30 NaCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 EGTA y 10 HEPES-CsOH (pH 7.3).

Las corrientes de sodio activadas por voltaje fueron evocadas por pulsos despolarizantes de 16 milisegundos (ms) a 0 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV cada 10 seg. El protocolo de voltaje para construir la relación corriente-voltaje (*I-V*) fue el siguiente: la membrana plasmática fue mantenida a -100 mV y después despolarizada a potenciales desde -80 hasta +80 mV, en incrementos de 5 mV, por la aplicación de breves (16 ms) despolarizaciones a una frecuencia de 0.1 Hz. Las amplitudes de corriente fueron normalizadas a la capacitancia celular y expresadas como densidad de corriente (pA/pF). La curva de activación de los canales Nav1.6 se construyó calculando la conductancia de sodio a cada potencial de prueba: $G = I_{\text{Na}} / (V_m - V_{\text{rev}})$; donde G es el valor de conductancia; I_{Na} es la amplitud de la corriente; V_m es el potencial de membrana en cuestión, y V_{rev} es el potencial de inversión de la I_{Na} . Posteriormente, los valores de conductancia se normalizaron respecto a su valor máximo y se graficaron en función del valor de V_m . Los puntos experimentales obtenidos fueron ajustados a una función tipo Boltzmann de la siguiente forma: $G = G_{\text{max}} / (1 + \exp(-(V_m - V_{1/2})/k))$, donde G_{max} es la máxima conductancia para el ion Na⁺, V_m es el potencial de prueba, $V_{1/2}$ es el voltaje al cual se activa la mitad de la conductancia máxima, y k es la pendiente de la relación.

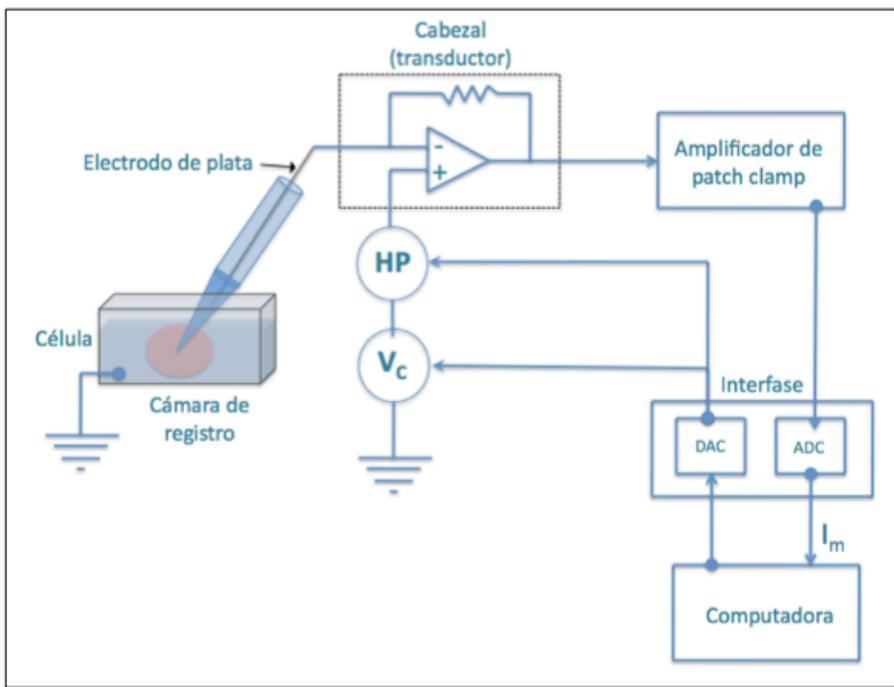


Figura 11. Esquema del registro electrofisiológico utilizado para los experimentos de fijación de voltaje. Las corrientes de sodio generadas por los canales Nav1.6 fueron registradas usando la técnica de *patch-clamp* en la configuración de célula completa. El amplificador operacional contenido en el cabezal controla el valor de voltaje impuesto por el electrodo de plata y cuantifica al mismo tiempo la corriente iónica que fluye a través de la membrana celular. Los pulsos comando (V_c) se generaron en el convertidor digital-análogo (DAC) de la interfase, mientras que el potencial de mantenimiento (HP) entre cada pulso fue generado por el amplificador de *patch-clamp*. El amplificador permite reducir manualmente las espigas de corriente capacitiva asociadas a la instalación y corte de pulsos despolarizantes. La señal de corriente iónica inducida por V_c fue digitalizada mediante el convertidor analógico-digital (ADC) de la interfase y almacenada en el disco duro de una computadora para su posterior análisis. Las corrientes iónicas (I_m) son visualizadas en el monitor de la computadora para apreciar la formación del sello de alta resistencia entre la punta del electrodo y la membrana celular, así como para supervisar la cancelación analógica de las espigas capacitivas.

Ensayos de invasividad

La capacidad invasiva de las células de cáncer de cérvix fue analizada utilizando cámaras de invasión celular (Corning® BioCoat Matrigel®, Corning, NY, EUA) (Fig. 12). Células de cáncer de cérvix (1×10^5) transfectadas transitoriamente con el canal Nav1.6 fueron sembradas en insertos previamente equilibrados en ausencia o presencia de 1 μm de TTX; inhibidores de proteasas: GM6001, 25 μM (Millipore); E-64, 100 μM (Calbiochem; San Diego, CA, EUA); Leupeptina, 100 μM (Thermo Fisher Scientific); o en presencia del inhibidor específico del transportador NHE-1, EIPA 5-(*N*-etil-*N*-

isopropil) amilorida), 1 μ M (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Un gradiente de 10% de suero fetal bovino entre ambos compartimentos fue usado como quimio atrayente. Células de cáncer de cérvix que transfectadas únicamente con el plásmido para GFP y sometidas el mismo procedimiento fueron usadas como control. Las cámaras fueron incubadas durante 48 h a 37°C, 5% de CO₂ y en una atmósfera saturada de agua. Después del tiempo de incubación, las células en la cara superior de la membrana del inserto fueron removidas con la ayuda de un hisopo de algodón; mientras que las células en la cara inferior de la membrana del inserto (células que invadieron) fueron incubadas durante 3 h en 400 μ l medio de cultivo fresco suplementado con el reactivo MTT (ATCC). Transcurrido el tiempo de incubación, el medio de cultivo fue removido y las sales de formazán producidas fueron disueltas en 350 μ l de DMSO. La invasividad celular fue estimada por las mediciones de absorbancia a 570 nm. En todos los casos, tres experimentos independientes por triplicado fueron realizados.

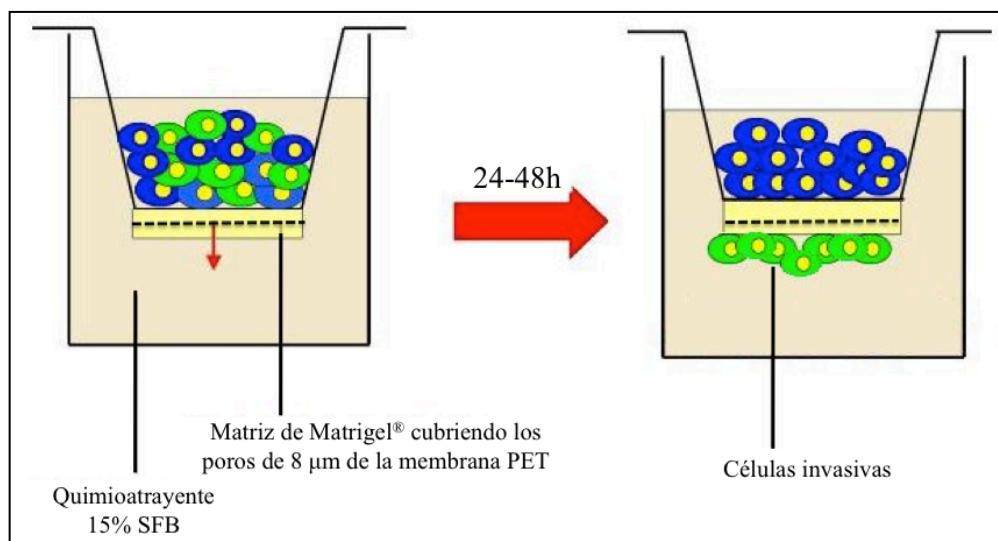


Figura 12. Representación esquemática del ensayo de invasividad. Las células de cáncer de cérvix fueron resuspendidas en medio de cultivo con 5% de SFB y sembradas en el compartimento superior (inserto) de la cámara de invasividad. La cámara está formada por un inserto con una membrana PET con poros de 8 μ m de diámetro uniformemente recubierta con una matriz de Matrigel® y suspendida en un pozo de una típica placa de cultivo de 24 pozos. La matriz representa una barrera física para las células no invasivas mientras que proporciona una estructura apropiada para las células invasivas. En el compartimento inferior (pozo) fue adicionado medio de cultivo con alto contenido de SFB (15%) que actuó como quimio atrayente (Ilustración modificada de [47]).

Ensayo de herida en monocapa

Las células de cáncer de cérvix transfectadas transitoriamente para sobre-expresar los canales Nav1.6 fueron sembradas a una alta densidad (95-100% confluencia) en placas de 6 pozos durante 24 h. La migración celular fue evaluada mediante la técnica de herida en monocapa (**Fig. 13**). Las monocapas celulares fueron ayunadas por 12 h e incubadas con 12- μ M Mitomicina C durante 2 h con el fin de arrestar el ciclo celular y evitar la proliferación celular durante este ensayo. Las heridas fueron realizadas por rasgaduras horizontales con la ayuda de una punta estéril de 10 μ l; las células desprendidas fueron lavadas dos veces con PBS y removidas. Las células adheridas fueron incubadas en medio de cultivo fresco con bajo contenido de SFB en ausencia o presencia de 1 μ M de TTX.

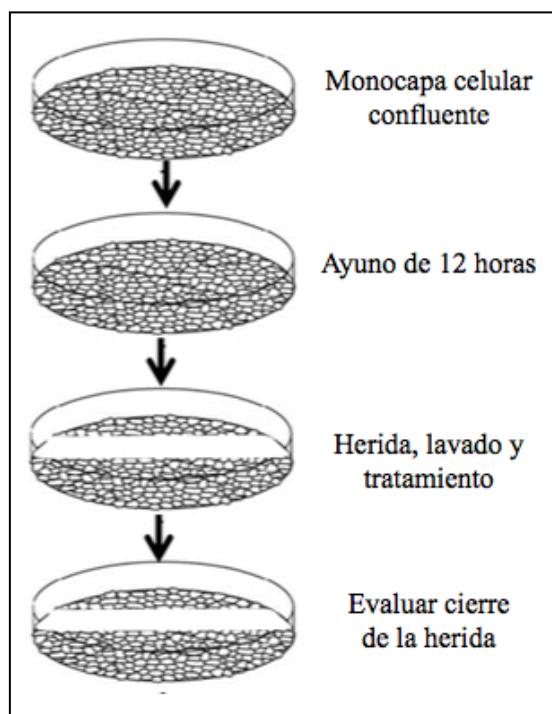


Figura 13. Representación esquemática del ensayo de herida en monocapa para evaluar la migración celular. Las células de cáncer de cérvix fueron sembradas a alta densidad para alcanzar una confluencia total. Posteriormente fueron sometidas a un ayuno de 12 h e incubadas con Mitomicina C para detener la proliferación celular. La herida fue realizada con una punta de plástico de 10 μ l y las células desprendidas fueron lavadas con PBS y removidas. Las heridas fueron incubadas en ausencia o presencia de 1 μ M de TTX durante 48 h en medio de cultivo bajo en SFB. Células bajo las mismas condiciones incubadas en medio de cultivo con alto contenido de SFB fueron usadas como control positivo (Ilustración modificada de [48]).

Como condición control se usaron células de cáncer de cérvix únicamente transfectadas con el plásmido para la GFP. Simultáneamente, células de cáncer de cérvix ordinarias, es decir, sin ningún procedimiento de transfección; fueron incubadas en medio de cultivo con alto contenido de SFB y a esta condición se le denominó control positivo. El estado inicial de la herida y el estado final (después de 48 h) debido a la migración celular fue fotografiado usando un microscopio invertido Olympus IX71 acoplado a un sistema de adquisición Evolution VF Fast Cooled Color Camera (Media Cybernetics Inc.; Rockville, MD, EUA). La migración celular fue expresada en porcentaje y calculada como la diferencia de áreas: Área Cubierta a las 48 h – Área Cubierta en la Herida Original; entendiéndose por área cubierta como el área total en la fotografía cubierta por células de cáncer de cérvix. Tres experimentos independientes fueron realizados por triplicado.

Ensayos de Proliferación

Células de cáncer de cérvix transfectadas transitoriamente para sobre-expresar los canales Nav1.6 fueron sembradas por triplicado a una densidad de 5×10^3 células/ml en placas de 48 pozos. La proliferación celular fue seguida por un total de 96 h en ausencia y presencia de $1\mu\text{M}$ de TTX. Células de cáncer de cérvix transfectadas únicamente con el plásmido que codifica para la GFP y sometidas al mismo procedimiento fueron usadas como control. El medio de cultivo y la TTX fueron cambiados diariamente. La proliferación celular fue medida usando el método de absorbancia de sales de formazán. El MTT fue adicionado a las células después de transcurrido el tiempo de estudio y fue incubado durante 3 h. Finalmente, el medio de cultivo fue removido y las sales de formazán formadas fueron disueltas en DMSO. Tres experimentos independientes fueron realizados por triplicado.

Zimografía

Medios condicionados obtenidos a partir de cultivos celulares de células de cáncer cérvix transfectadas con el plásmido para Nav1.6 y GFP fueron concentrados usando filtros Amicon 3000 (Merck-Millipore) y analizados mediante zimografía (**Fig. 14**).

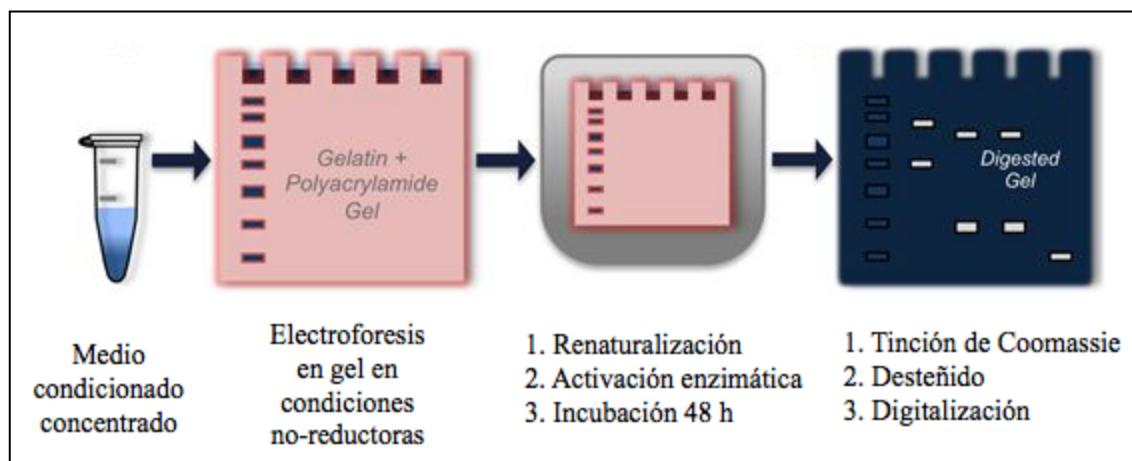


Figura 14. Representación esquemática del análisis de la actividad de las MMPs mediante zimografía. Los medios condicionados obtenidos a partir de cultivos de células de CaCu bajo diferentes condiciones experimentales fueron concentrados por centrifugación y sometidos a separación electroforética en condiciones no reductoras. La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida al 8% co-polimerizados con gelatina (substrato de las MMPs). Después de la electroforesis los geles son lavados e incubados en un buffer de actividad enzimática durante 48 h. La actividad enzimática se evalúa mediante la tinción de los geles con azul de Coomassie en busca de bandas claras (no teñidas) producto de la actividad proteolítica de las MMPs sobre su substrato (Ilustración modificada de [49]).

Un medio condicionado como control positivo fue obtenido a partir de células MCF-7 tratadas con 100 ng/ml de PDB (phorbol 12, 13-dibutirato) durante 40 h. Volúmenes iguales de cada muestra fueron mezclados con buffer de carga (2.5% SDS, 1% glucosa, 4- μ g/ml de rojo de fenol) bajo condiciones no-reductoras e incubados durante 30 min a temperatura ambiente. Las muestras fueron sometidas a separación electroforética en geles de poliacrilamida al 8% co-polimerizados con gelatina (1 mg/ml). Después de la electroforesis, los geles fueron lavados dos veces con 2.5% Tritón X-100 e incubados en buffer de actividad (50 mM TRIS-HCl, pH 7.4, 5 mM CaCl₂) a 37°C por 48 h. Posteriormente, los geles fueron fijados y teñidos con 0.25% Azul de Coomassie en

10% de ácido acético y 30% de metanol. La actividad proteolítica fue detectada como bandas claras contrastando con un fondo azul de sustrato no digerido.

Análisis Estadísticos

Los resultados cuantitativos son mostrados como la media \pm error estándar (EE) o desviación estándar (DE). Las diferencias entre valores promedio fueron evaluadas con una *t* de Student no pareada y fueron aceptados como diferencias estadísticamente significantes si la *P* < 0.05. Adicionalmente, una prueba Mann-Whitney fue usada cuando la prueba cuando los datos experimentales no se ajustaron a una distribución normal. El análisis de la curva ROC (*Receiver Operator Characteristic*; [50]) fue realizado para seleccionar el mejor punto de corte de los valores de *fold-change* (veces de cambio) de los experimentos de qPCR con la finalidad de distinguir entre tumores invasivos y sujetos control. En análisis de datos y generación de gráficos fue realizado usando GraphPad Prism versión 6.01 para Windows (La Jolla, CA, EUA) y el programa SPSS versión 17.0.

RESULTADOS

La sobre expresión del gen *SCN8A* es una característica distintiva del cáncer cervicouterino invasivo

Los canales Nav1.6 están abundantemente expresados en el sistema nervioso central y periférico, particularmente en los nodos de Ranvier, sinapsis y dendritas, en donde ellos juega un papel esencial generando potenciales de acción para la rápida propagación de señales eléctricas [51]. En consecuencia, la pérdida de la función de los canales Nav1.6 causa severos desordenes motrices y cognitivos [52, 53]. Por otra parte, existen varias evidencias que muestran la expresión de los canales Nav1.6 en células consideradas como no excitables, normales y cancerosas, donde ellos participan activamente en procesos celulares fisiológicos [54-58] y fisiopatológicos [30, 31, 43, 59], respectivamente. Nuestro grupo de trabajo previamente ha demostrado que el gen *SCN8A* el cual codifica para los canales de sodio Nav1.6, es 40-veces más abundante en muestras de cáncer cervicouterino positivo para VPH16 comparado con el cérvix no canceroso [45]. Por lo tanto, en el presente trabajo de tesis doctoral investigamos si la expresión anormal del gen *SCN8A* es una característica compartida para los casos de cáncer cervicouterino positivos a otros principales tipos de VPH oncogénicos. Para abordar esta interrogante, el RNA total aislado a partir de biopsias humanas de cérvix no canceroso (CNC), neoplasias intraepiteliales cervicales de bajo (NIC-1) y alto grado (NIC-2/3), así como de cáncer cervicouterino invasivo (CaCu) (**Tabla 1**) fue empleado para los experimentos de qPCR. La expresión del gen *I8S* fue examinada en todas las muestras y fue usado como gen de referencia para el análisis cuantitativo de los resultados (**Fig. 15**).

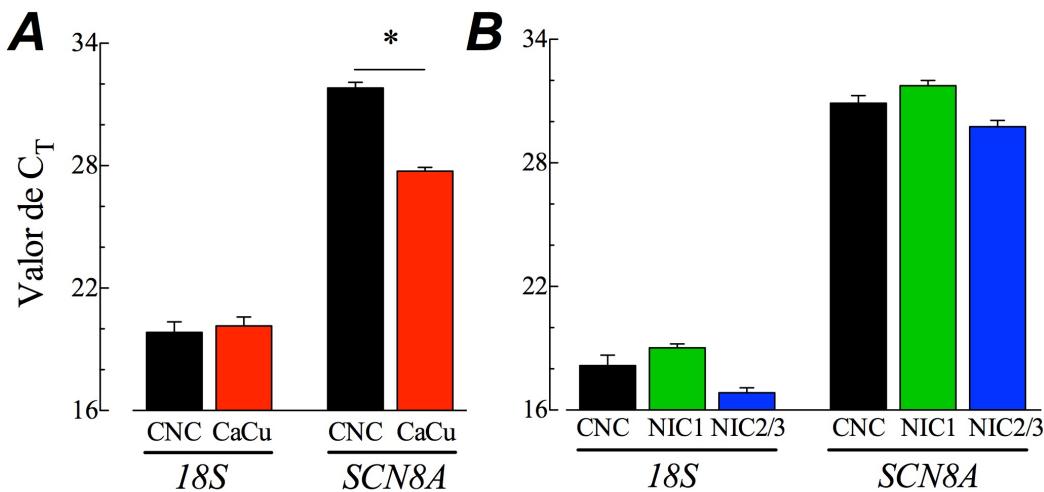


Figura 15. Niveles de expresión de los genes *18S* y *SCN8A* en biopsias de tejido cervical humano. A, promedio de los valores de C_T (promedio \pm EE) para los genes *18S* y *SCN8A* expresados en cérvix no canceroso, CNC ($n = 20$) versus cáncer cervicouterino invasivo, CaCu ($n = 57$). B, promedio de los valores de C_T para los genes *18S* y *SCN8A* expresados en cérvix no canceroso versus neoplasias intraepitelial cervical de bajo (NIC1, $n = 23$) y alto (NIC2/3, $n = 16$) grado. *Diferencia significativa con $P < 0.05$.

El valor de C_T es inversamente proporcional a la cantidad inicial del mRNA del gen de interés de la muestra en cuestión. Los resultados muestran que los valores de C_T para el gen *18S* en las muestras de CNC, neoplasias intraepiteliales cervicales de bajo y alto grado así como en las muestras de CaCu son similares (Fig. 15), lo cual es una condición para la elección de un gen de referencia en los experimentos de qPCR. Por otra parte, los valores de C_T para el gen *SCN8A* en las muestras de cáncer cervicouterino son menores con respecto a aquellos obtenidos en las muestras CNC y las diferencias entre valores son estadísticamente significativas (Fig. 15A). Los niveles de expresión del gen *SCN8A* son muy semejantes entre las muestras de CNC y las neoplasias intraepiteliales de bajo y alto grado (Fig. 15B) sugiriendo que la desregulación ocurre hasta la aparición del cáncer cervicouterino.

En análisis de la expresión génica indica que el gen *SCN8A* es sobre expresado en las muestras de cáncer cervicouterino invasivo independientemente del tipo de VPH que se encuentre presente, no obstante, dicha sobre expresión no fue observada en los casos de

neoplasias intraepiteliales cervicales de bajo (NIC1) y alto (NIC2/3) grado (**Fig. 16**), apoyando la hipótesis que la sobre expresión del gen *SCN8A* está asociada con la transformación de las células del epitelio humano de cérvix.

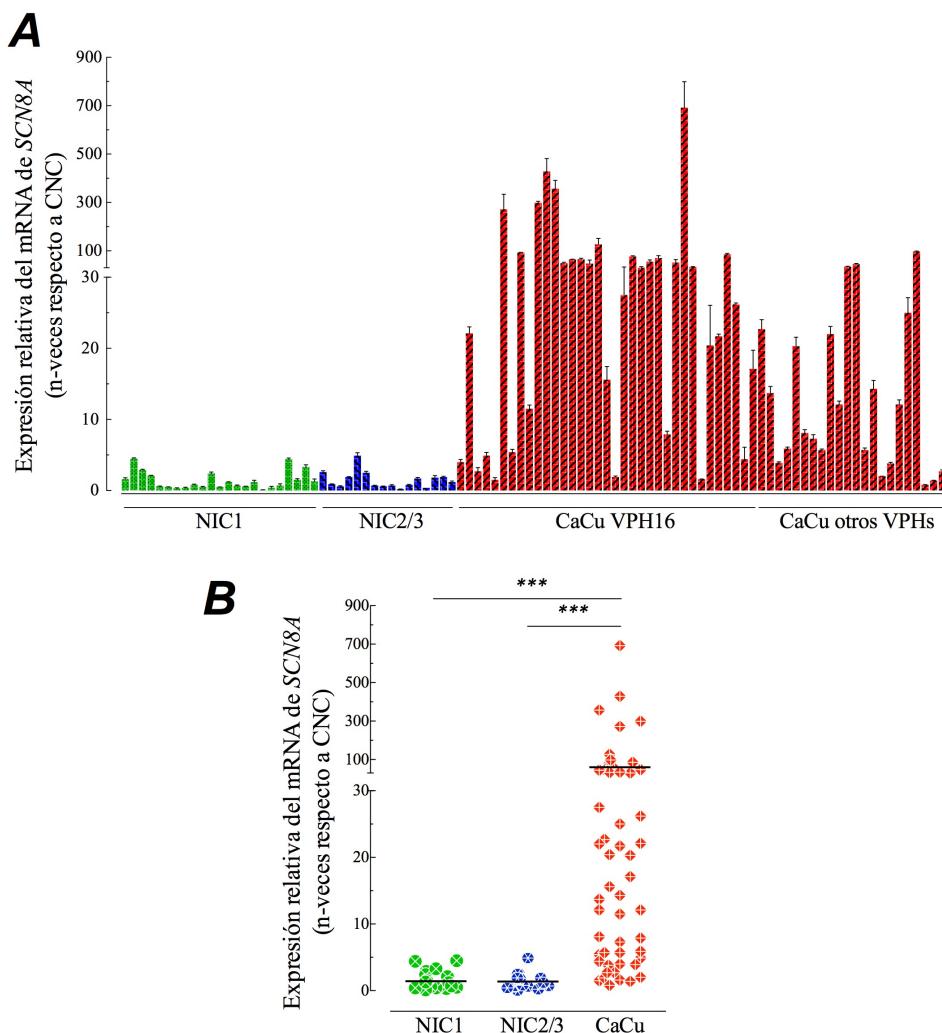


Figura 16. Exploración de la expresión del gen *SCN8A* en la secuencia neoplasia–carcinoma del tejido de cérvix humano. **A**, niveles de expresión del gen *SCN8A* en neoplasia intraepitelial cervical de bajo (NIC1, $n = 23$) y alto (NIC2/3, $n = 16$) grado, así como en cáncer cervicouterino invasivo positivo para el VPH16 (CaCu VPH16, $n = 35$) y cáncer cervicouterino invasivo positivo a otros tipos de VPH oncogénicos (CaCu otros VPHs, $n = 22$), versus muestras de cérvix no canceroso (CNC, $n = 20$). Las barras muestran el valor promedio de la relación *fold-change* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) del gen *SCN8A* para las muestras individuales de cada grupo. **B**, gráfica de dispersión de los valores de *fold-change* para cada grupo de muestras. Las líneas negras horizontales significan los valores promedio de *fold-change*. Los resultados muestran que el gen *SCN8A* fue significativamente sobreexpresado en el tejido humano de cáncer cervicouterino invasivo (Mann-Whitney, $P < 0.001$).

Por otra parte, también analizamos si existía una relación entre los niveles de expresión del gen *SCN8A* en las muestras de CaCu con el estadio de la enfermedad de acuerdo a la clasificación de FIGO [60] de los carcinomas cervicouterinos (**Fig. 17**). Los resultados indican que no existen diferencias en los niveles de expresión del gen *SCN8A* entre los diferentes estadios del cáncer cervicouterino humano.

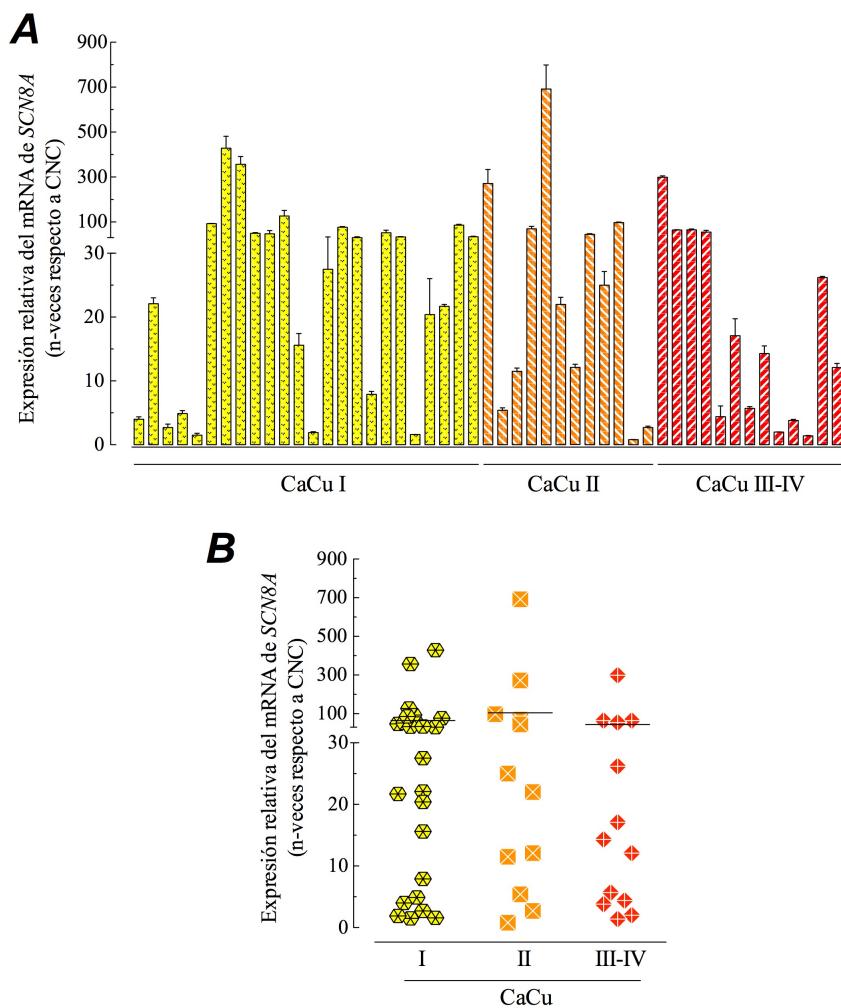


Figura 17. Niveles de expresión del gen *SCN8A* en biopsias de cáncer cervicouterino clasificadas de acuerdo al sistema FIGO. **A**, muestras de cáncer cervicouterino positivas a los principales VPH oncogénicos fueron analizadas mediante qPCR. Las barras muestran el valor promedio de la relación *fold-change* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) del gen *SCN8A* para las muestras individuales agrupadas de acuerdo al sistema FIGO. **B**, gráfica de dispersión de los valores de *fold-change* para cada grupo de muestras. Las líneas negras horizontales significan los valores promedio de *fold-change*. La expresión del gen *SCN8A* no fue estadísticamente diferente entre los estados de FIGO.

Adicionalmente, nos preguntamos si los niveles de expresión del gen *SCN8A* eran diferentes dependiendo del origen celular del cáncer cervicouterino, es decir, si la

transformación original sucedió en células glandulares del cérvix o correspondía a un carcinoma de células escamosas. Para ello, la Dra. Ana Alfaro, experta patóloga del Hospital General de México, clasificó las muestras de cáncer cervicouterino y nos proporcionó la información. Los resultados indican que tampoco existen diferencias en los niveles de expresión del gen *SCN8A* entre cáncer cervicouterino de fenotipo glandular o de células escamosas (**Fig. 18**).

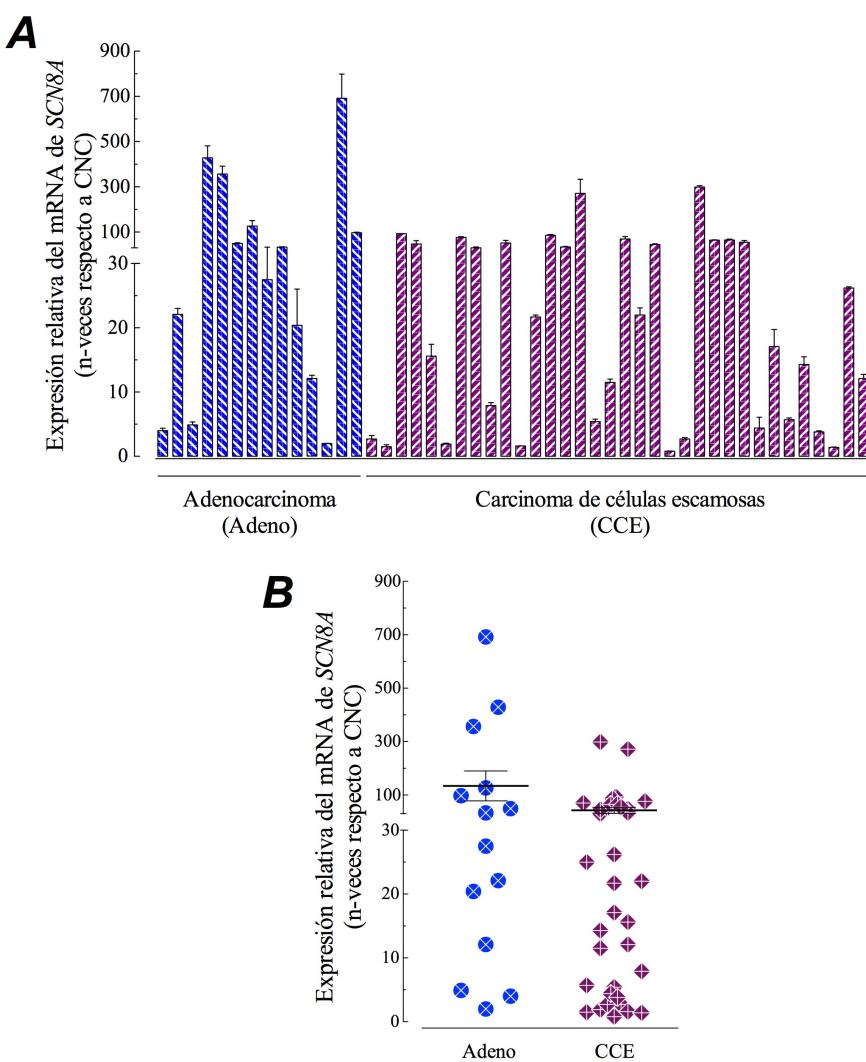


Figura 18. Niveles de expresión del gen *SCN8A* en función del tipo histológico del cáncer cervicouterino. A, muestras de CaCu positivas a los principales VPH oncogénicos fueron analizadas mediante qPCR. Las barras muestran el valor promedio de la relación *fold-change* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) del gen *SCN8A* para las muestras individuales agrupadas de acuerdo a las características histológicas del cáncer cervicouterino, adenocarcinoma o carcinoma de células escamosas. B, gráfica de dispersión de los valores de *fold-change* para cada grupo de muestras. Las líneas negras horizontales significan los valores promedio de *fold-change*. La expresión del gen *SCN8A* no fue estadísticamente diferente entre los tipos histológicos de cáncer cervicouterino.

Posteriormente, con el fin de probar la hipótesis concerniente al uso de los niveles de expresión del gen *SCN8A* como un parámetro para diferenciar las muestras de cáncer cervicouterino de las muestras de cérvix no canceroso, utilizamos la información obtenida con los experimentos de qPCR y realizamos un análisis de la curva ROC con estos datos. El análisis de ROC indica que es posible diferenciar entre muestras de cérvix no canceroso (CNC) de aquellas de cáncer cervicouterino (CaCu) con una alta sensibilidad (98%) y una aceptable especificidad (82%) usando únicamente los niveles de expresión del gen *SCN8A* (**Fig. 19**).

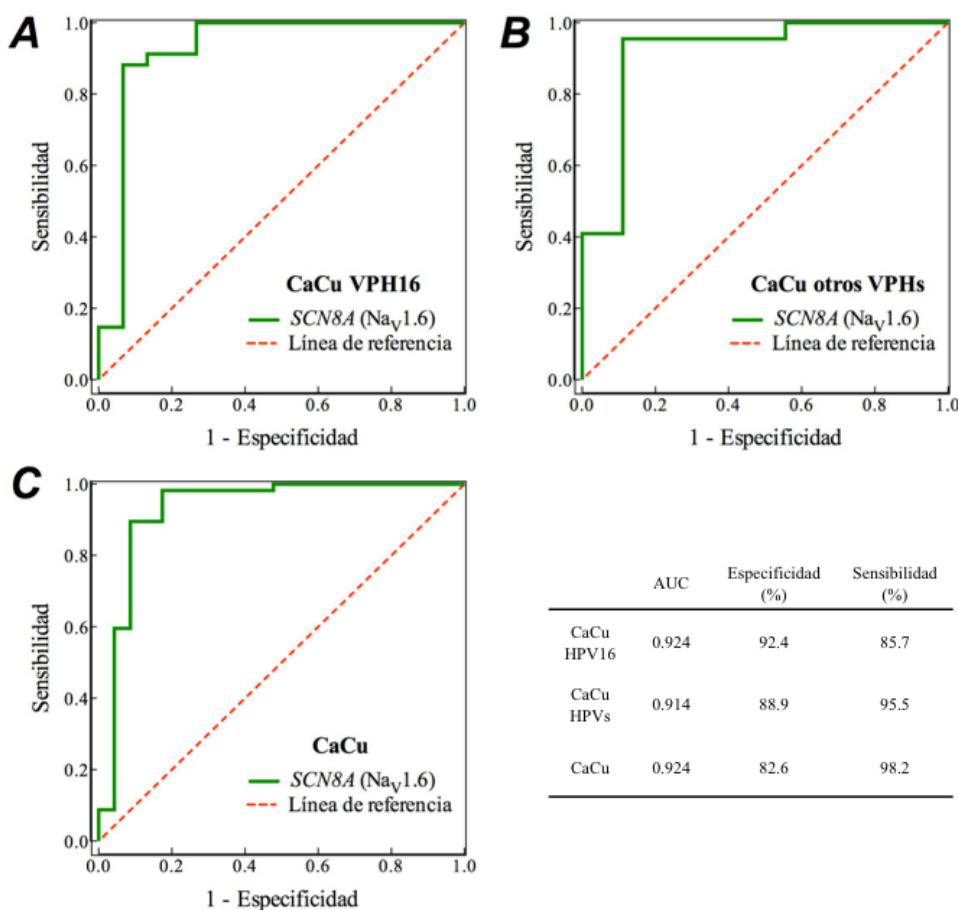


Figura 19. Análisis de ROC para el gen *SCN8A* expresado en tejido de cérvix humano. Los niveles de expresión del gen *SCN8A* en cérvix no canceroso (CNC, $n = 20$) fueron correlacionados con aquellos obtenidos a partir de muestras de CaCu positivas al VPH16 (**A**) (CaCu-VPH16, $n = 35$), con aquellos provenientes de otros tipos de VPH oncogénicos (**B**) (CaCu-VPHs, $n = 22$) y de manera global con la totalidad de casos de cáncer cervicouterino (**C**) (CaCu, $n = 57$) con el fin de obtener los parámetros de especificidad y sensibilidad mediante el análisis de la curva de ROC. La tabla resume los resultados del análisis de ROC. Los niveles de expresión del gen *SCN8A* permiten diferenciar entre muestras de cáncer cervicouterino positivas a los principales VPH oncogénicos de aquellas de cérvix no canceroso con una especificidad del 82.6% y con una sensibilidad del 98.2%

Análisis de la expresión de la proteína de los canales Nav1.6 en la secuencia neoplasia-carcinoma del tejido de cérvix humano

Debido a que la correlación entre los niveles de expresión a nivel de mRNA y proteína en los sistemas biológicos es notablemente pobre [61], decidimos explorar la expresión de la proteína de Nav1.6 en el tejido de cérvix humano. Los extractos de proteína total obtenidos a partir de muestras de cérvix no canceroso (CNC), neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y cáncer cervicouterino (CaCu) fueron empleados para los experimentos de Western blot. Nuestros resultados demuestran la presencia de la proteína de Nav1.6 en los tres grupos de estudio, sin embargo, ésta fue dos veces más abundante en el cáncer cervicouterino comparado con cérvix no canceroso o las muestras de neoplasias (**Fig. 20**).

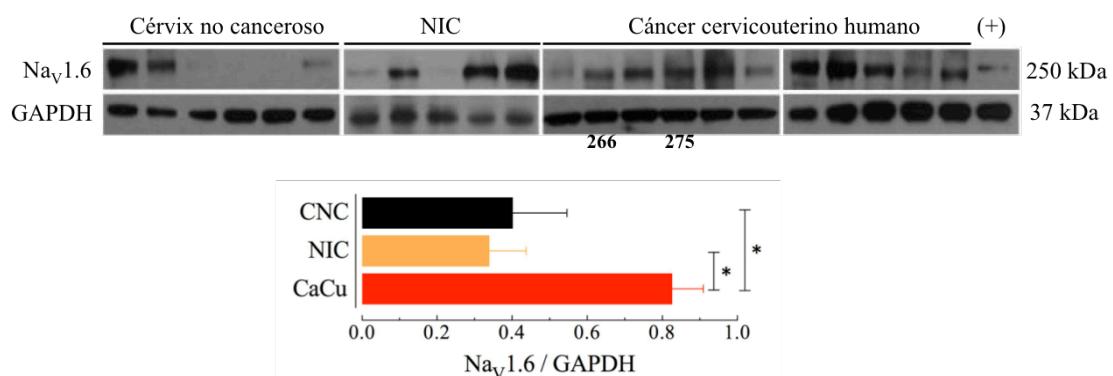


Figura 20. Expresión de la proteína de Na_v1.6 en la secuencia neoplasia-carcinoma de tejido de cérvix humano. Análisis por Western blot de la expresión de la proteína de Na_v1.6 en los extractos totales provenientes de muestras de cérvix no canceroso, neoplasia y cáncer cervicouterino. Extractos de proteína total obtenidos a partir de células HEK293 que expresan establemente al canal Na_v1.6 fueron usados como control positivo. El resultado es representativo de cuatro experimentos independientes. Los números colocados debajo de los blots corresponden al número de muestra. Las muestras 266 y 275 son aquellas que están presentes en todos los experimentos de Western blot mostrados en este trabajo. El gráfico inferior muestra la expresión relativa de la proteína del Na_v1.6 en las muestras de tejido de cérvix humano. Las bandas de proteína fueron cuantificadas por densitometría y normalizadas a la expresión de la GAPDH para cérvix no canceroso ($n = 12$), neoplasia ($n = 10$) y cáncer cervicouterino ($n = 29$). *Diferencias significativas ($P < 0.05$).

Adicionalmente, la proteína de Na_v1.6 fue encontrada en el 100% de las muestras de cáncer cervicouterino, mientras que solamente el 50% de las muestras de cérvix no canceroso y el 80% de las neoplasias expresaron la proteína del canal Na_v1.6.

Inmunodetección de la proteína de Nav1.6 en cortes histológicos del cérvix humano

Para evaluar la presencia y distribución de la proteína del canal Nav1.6 en el tejido de cérvix humano, realizamos experimentos de inmunohistoquímica convencional usando tres microarreglos de tejido (MAT) preparados en el Hospital General de México. Cada MAT incluyó muestras de cérvix no canceroso, neoplasias de bajo y alto grado, así como muestras de cáncer cervicouterino, por lo tanto, cada grupo de muestras fue sometido a las mismas condiciones experimentales para explorar la expresión de la proteína de los canales Nav1.6. Nuestros resultados indican que la proteína de los canales Nav1.6 se expresa en la mayoría de las muestras de tejido de cérvix (**Fig. 21**), no obstante, la expresión de la proteína del Nav1.6 incrementa en función de la transformación del tejido epitelial del cérvix. Los niveles de expresión de la proteína de Nav1.6 fueron similares entre muestras de cérvix no canceroso (CNC) y neoplasia intraepitelial cervical de bajo grado (NIC1), pero estos fueron substancialmente bajos comparados con aquellos encontrados en neoplasia intraepitelial cervical de alto grado (NIC2/3) y cáncer cervicouterino (CaCu), sugiriendo que la sobre expresión de la proteína de Nav1.6 ocurre cuando las células del epitelio del cérvix han sido transformadas y el tejido muestra características histológicas invasivas. Importantemente, la proteína de los canales Nav1.6 parece estar completamente distribuida en la membrana plasmática y al interior de las células de cáncer de cérvix (**Fig. 21**; fila inferior, imágenes $\times 10$ y $\times 40$); por el contrario, en las células de cérvix no canceroso, la localización de la proteína de Nav1.6 es más bien restringida a la membrana plasmática (**Fig. 21**; fila superior, imágenes $\times 10$ y $\times 40$). Estas observaciones ya habían sido previamente reportadas por nuestro grupo de investigación [45]. Ninguna

señal fue observada en las muestras de tejido que fueron incubadas con un anticuerpo primario irrelevante como control negativo (**Fig. 21**; columna de la extrema derecha).

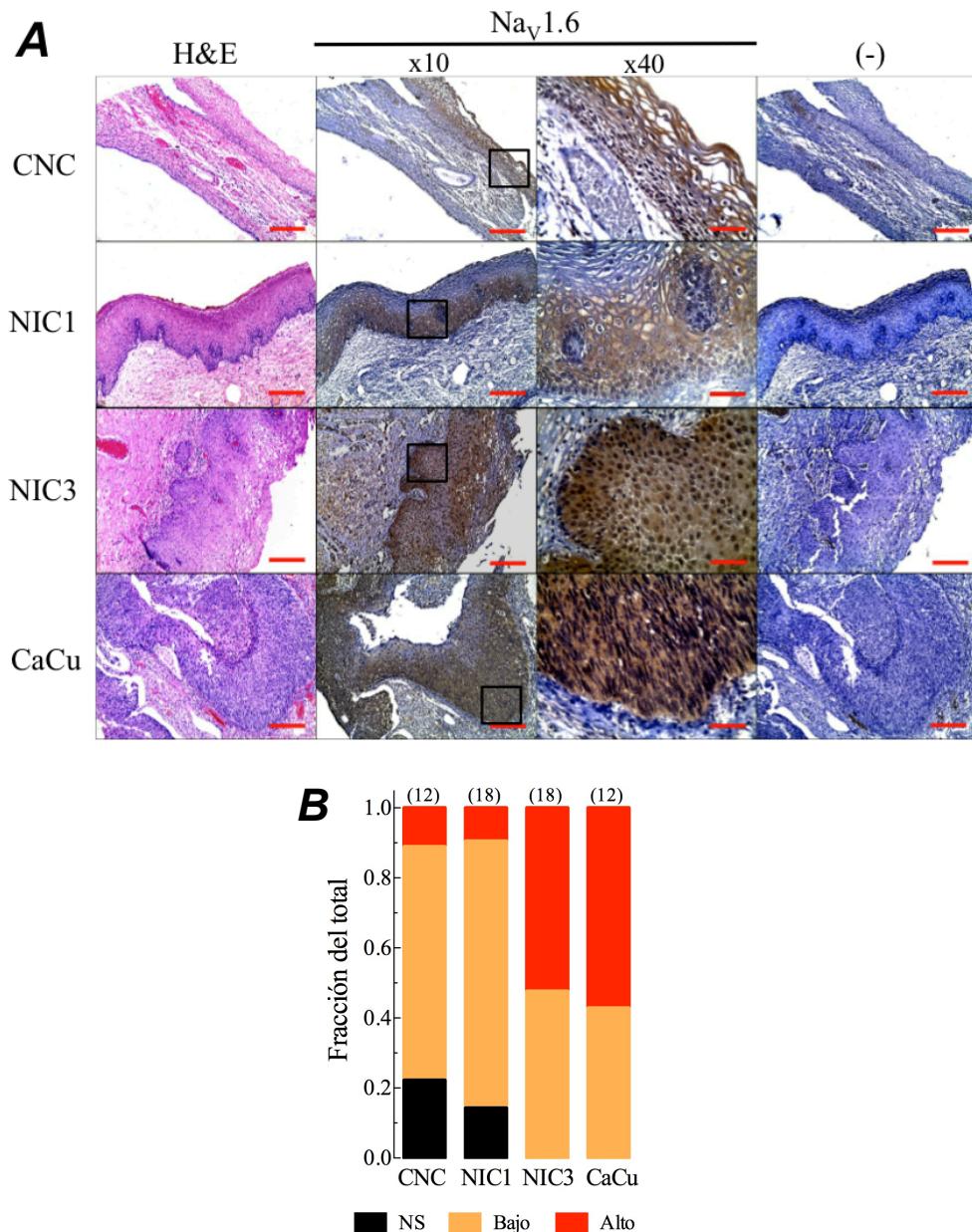


Figura 21. Análisis inmunohistoquímico de los canales $\text{Na}_v1.6$ en tejido de cérvix humano. A, imágenes representativas de cérvix no canceroso (CNC), neoplasia intraepitelial de bajo grado (NIC1), neoplasia intraepitelial de alto grado (NIC3) y cáncer cervicouterino (CaCu), mostrando la tinción de hematoxilina-eosina H&E (columna izquierda), detección inmunohistoquímica del canal $\text{Na}_v1.6$ a una amplificación de $\times 10$ y $\times 40$ (columnas centrales) y los controles negativos (columna derecha). La escala representa 100 y 300 μm para las microfotografías adquiridas a $\times 10$ y $\times 40$, respectivamente. B, fracción del total de señal positiva para cada grupo de muestras analizadas. La intensidad de inmunoreactividad para el canal $\text{Na}_v1.6$ fue evaluada como sin reacción (NS, negro), reacción baja (Baja, anaranjado) y reacción alta (Alta, rojo) en las muestras de CNC, NIC1, NIC3 y CaCu. El número de muestras estudiadas está indicado entre paréntesis en la parte superior de cada columna.

Estos resultados muestran que la sobre expresión de la proteína del canal Nav1.6 es una característica común principalmente para el cáncer cervicouterino invasivo (independientemente del tipo de VPH), pero no para los estados tempranos de este carcinoma. Además, los resultados de inmunohistoquímica sugieren un cambio en la localización subcelular de la proteína del canal Nav1.6 como ya se había observado previamente en el cáncer cervicouterino positivo al VPH16 [45].

La mayoría de las células de cáncer cervicouterino no expresan corrientes de sodio activadas por voltaje en registros de *patch-clamp* en célula completa

Con la finalidad de incrementar nuestro conocimiento acerca de la participación de los canales Nav1.6 en la invasividad celular del cáncer cervicouterino [45], decidimos usar líneas celulares de cáncer cervicouterino comercialmente disponibles. En contraste con la expresión funcional de los canales Nav en las células primarias derivadas de tumores humanos del tejido cervical [44, 45], bajo nuestras condiciones experimentales y utilizando la técnica de *patch-clamp* en la modalidad de célula completa ($n > 50$ células), no encontramos corrientes de sodio activadas por voltaje en las líneas celulares de cáncer cervicouterino ampliamente conocidas como las HeLa (positiva a VPH18) y SiHa (positiva a VPH16). También exploramos en busca de corrientes de sodio en tres líneas celulares adicionales de cáncer cervicouterino, CaSki (positiva a VPH16), DotC2 (negativa a VPH) y ME-180 (positiva a VPH68); ninguna de ellas mostró evidencias de corrientes de sodio activadas por voltaje. Una excepción fue la línea celular C33A (negativa a VPH) donde un pequeño porcentaje de células (alrededor del 11%) expresa una pequeña, pero claramente distingible corriente de sodio (**Fig. 22**).

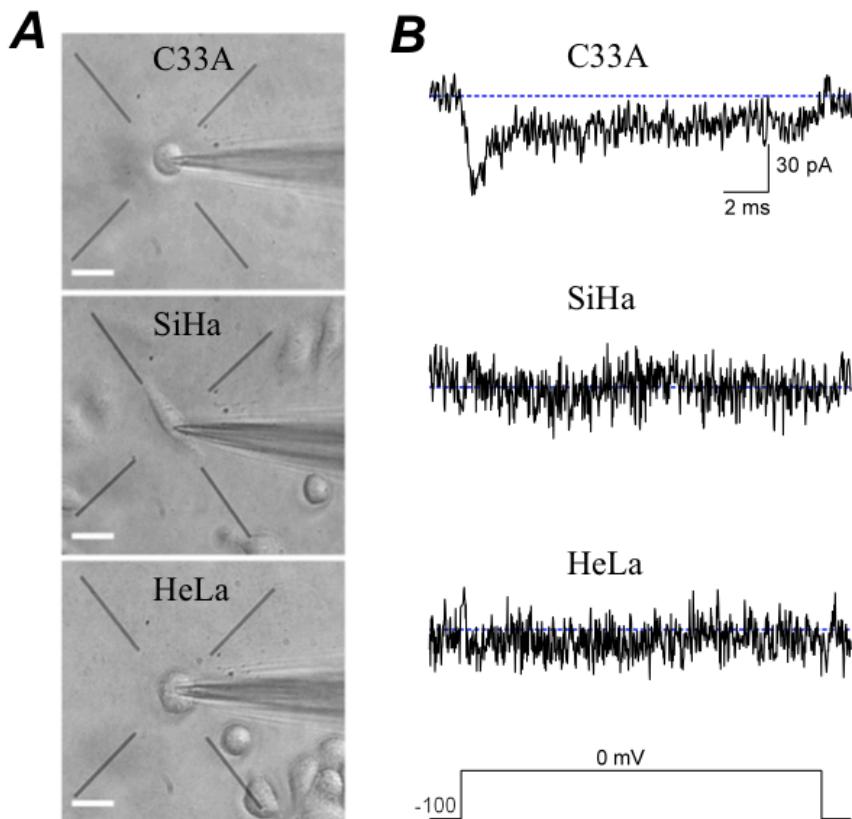


Figura 22. La mayoría de las líneas celulares comerciales de cáncer cervicouterino no expresan corrientes de sodio activados por voltaje. **A**, Microfotografías de las células C33A, SiHa y HeLa durante los registros electrofisiológicos con la técnica de *patch-clamp*. **B**, registros que muestran la presencia de un pequeño componente de corriente entrante activado por voltaje en las células C33A ($-4.1 \text{ pA/pF} \pm 0.8$; $n = 5$) y la ausencia de éste en las células HeLa y SiHa en respuesta a pulsos despolarizantes a 0 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -100 mV.

Es importante mencionar que la capacidad invasiva de las líneas celulares de cáncer cervicouterino C33A, SiHa y HeLa no sufrió afectación por la incubación con 1 μM de TTX, toxina comúnmente usada para bloquear la actividad de los canales Na_v (Fig. 23). Independientemente de esta enorme discrepancia entre cultivos primarios y líneas celulares de cáncer cervicouterino, varias posibilidades podrían explicar nuestros hallazgos:

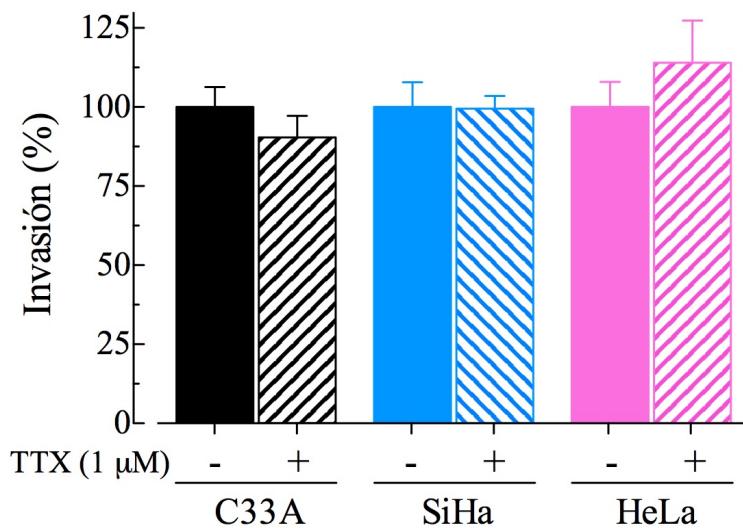


Figura 23. Capacidad invasiva basal de las líneas celulares de cáncer cervicouterino. Células C33A, SiHa y HeLa fueron sembradas a una densidad celular de 6×10^4 células por inserto en ausencia o presencia de 1 μM de TTX usando un gradiente de SFB de 10% durante 48 h. Las columnas representan el valor promedio y son expresadas como invasión relativa (promedio \pm DE, $n = 3$) normalizado a la condición control para cada tipo celular.

(1) que los transcritos no están siendo traducidos a la proteína del canal, (2) que efectivamente hayan sido traducidos pero no apropiadamente dirigidos hacia la membrana plasmática, y (3) que el canal está en la membrana plasmática pero no es funcional. Para responder a las interrogantes planteadas en esta etapa de nuestra investigación, realizamos experimentos de qPCR, microscopía confocal, Western blot y PCR convencional para explorar la expresión de los canales Nav1.6 en las líneas celulares de cáncer cervicouterino.

En primer lugar, los resultados de qPCR mostraron que las líneas celulares de cáncer cervicouterino C33A, SiHa y HeLa expresan el gen *SCN8A* a niveles semejantes a los encontrados en algunas biopsias humanas de cáncer cervicouterino (**Fig. 24**).

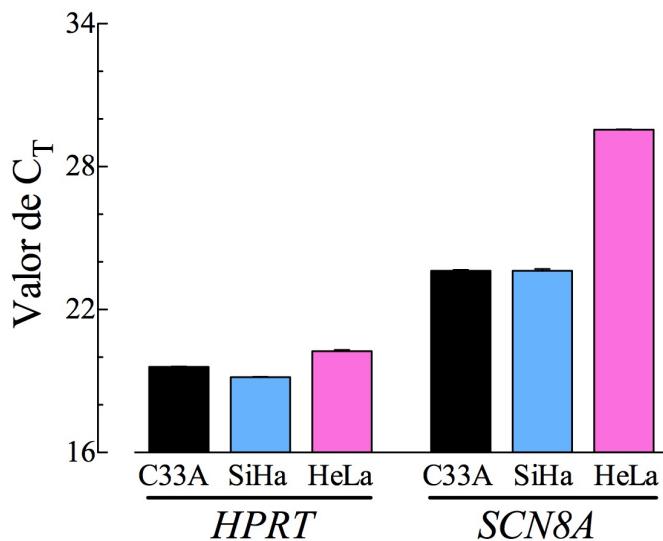


Figura 24. Niveles de expresión de los genes *HPRT1* y *SCN8A* en líneas celulares de cáncer cervicouterino. Las barras representan los valores promedio de C_T para cada gen en las líneas celulares de cáncer cervicouterino C33A, SiHa y HeLa ($n = 3$).

Estos resultados también indican que existen diferencias en los niveles de expresión del mensajero para los canales Nav1.6, ya que las células C33A y SiHa expresan 32 veces más copias del gen *SCN8A* respecto a las células HeLa, sugiriendo diferencias en los perfiles de expresión génica entre las líneas celulares de CaCu. Posteriormente, evaluamos la expresión de la proteína de Nav1.6 en las mismas líneas celulares de CaCu mediante experimentos de inmunofluorescencia y microscopía confocal. Los resultados obtenidos indican una señal correspondiente al canal Nav1.6 menos intensa y más difusa en las líneas celulares C33A, SiHa y HeLa comparada con las células control, que en este caso fueron células HEK-293 que expresan establemente al canal Nav1.6 (Fig. 25). En todas las líneas celulares la señal correspondiente al canal Nav1.6 fue fuertemente expresada en la vecindad de la membrana plasmática, no obstante, una localización intracelular de los canales Nav1.6 fue identificada principalmente en las líneas celulares de cáncer cervicouterino. Esto se observa claramente en las reconstrucciones tridimensionales de las imágenes adquiridas en el plano z , lo cual

sugiere una distribución intracelular de la proteína del Nav1.6 en las líneas celulares de cáncer cervicouterino, pero no para el control positivo, el cual mostró una señal intensa en la periferia de la célula (**Fig. 25**, columnas de la extrema derecha).

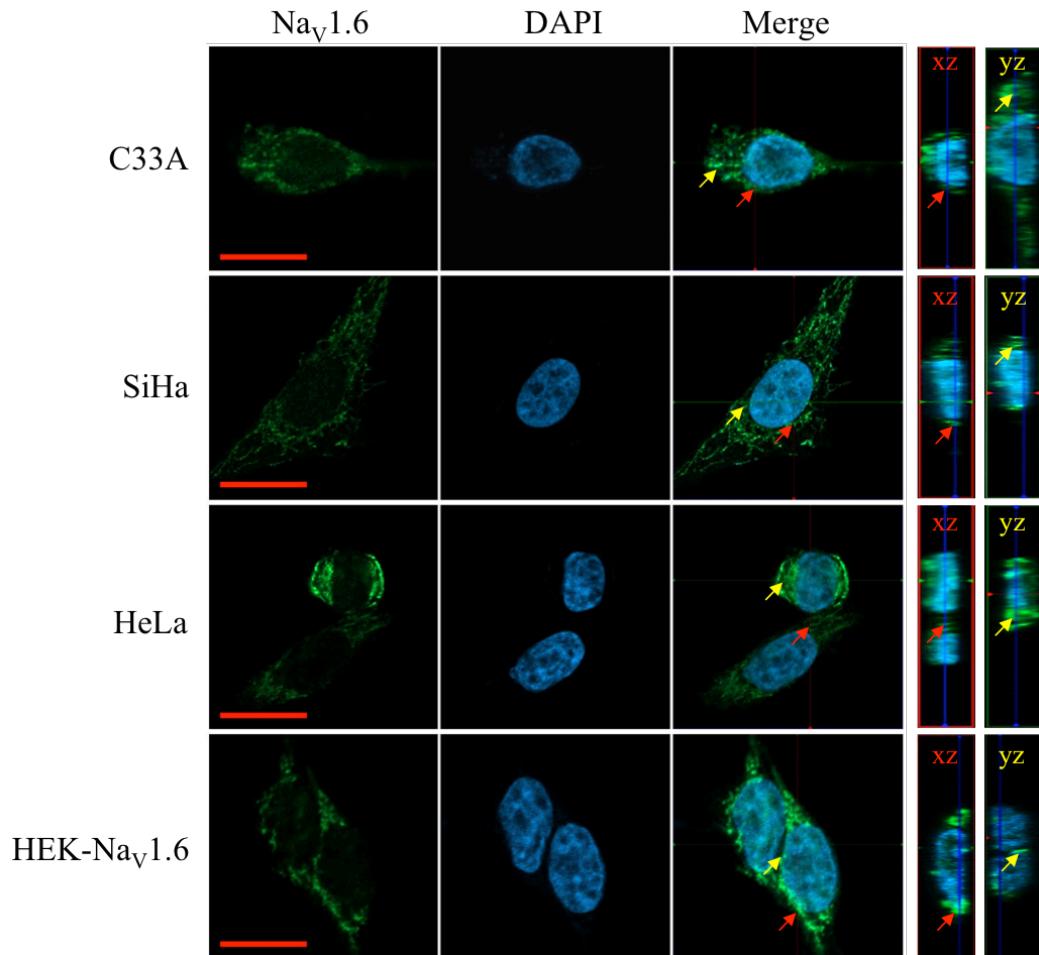


Figura 25. Expresión de los canales Nav1.6 en las líneas de cáncer cervicouterino. Análisis de la expresión de los canales Nav1.6 mediante experimentos de inmunofluorescencia y microscopía confocal en las líneas celulares de cáncer cervicouterino C33A, SiHa y HeLa, y en células HEK-293 que expresan establemente al canal Nav1.6. Cinco mil células de cada línea celular fueron sembradas en cajas Petri de 35 mm con fondo de cristal; se fijaron con paraformaldehído y se incubaron con el anticuerpo primario contra Nav1.6 seguidas por una incubación con el anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo FITC. Los núcleos fueron marcados con una solución de DAPI. La adquisición de imágenes fue realizada usando el objetivo de inmersión 63×/1.4DIC con una excitación secuencial en diferentes planos focales con un espaciamiento en el eje z de 0.33 μm a un grosor total de 6.5 μm. Los parámetros de ganancia del detector y poder de láser fueron mantenidos constantes para todas las preparaciones. Las secciones confocales fueron fusionadas y las reconstrucciones tridimensionales fueron realizadas a partir de los planos-z de cada región de interés. Proyecciones ortogonales de los planos xz y yz (columnas de la extrema derecha) de las imágenes confocales muestran una señal positiva para la proteína de Nav1.6 indicado con flechas rojas para los planos xz y con flechas amarillas para los planos yz. La escala representa 10 μm.

Con la finalidad de obtener evidencias adicionales acerca de la distribución celular de la proteína de los canales $\text{Na}_\text{V}1.6$ en las líneas celulares de cáncer cervicouterino, realizamos fraccionamiento celular de proteínas y experimentos de Western blot. La presencia de la proteína del canal $\text{Na}_\text{V}1.6$ fue analizada en las fracciones citoplasmáticas y nucleares, así como en los extractos totales de las células de cáncer cervicouterino. Los resultados muestran una banda correspondiente al canal $\text{Na}_\text{V}1.6$ (250 kDa) en el extracto total y la fracción citoplasmática de las células C33A (**Fig. 26**, flecha azul), no obstante, ninguna banda de 250 kDa fue identificada para las fracciones subcelulares ni para el extracto total de las células HeLa. Interesantemente, una banda de un peso molecular aparente de 150 kDa fue detectada en las fracciones nucleares enriquecidas de las células C33A y HeLa (**Fig. 26**, flecha roja). Estos resultados son consistentes con la observación de una pequeña corriente de sodio en las células C33A, las cuales expresan una proteína del $\text{Na}_\text{V}1.6$ de tamaño esperado. También son consistentes con la ausencia de corrientes de sodio en las células HeLa, las cuales solamente muestran una banda reactiva al anticuerpo contra $\text{Na}_\text{V}1.6$ de un peso molecular alrededor de 150 kDa.

Esta banda podría tratarse de una isoforma trunca del canal $\text{Na}_\text{V}1.6$ [62].

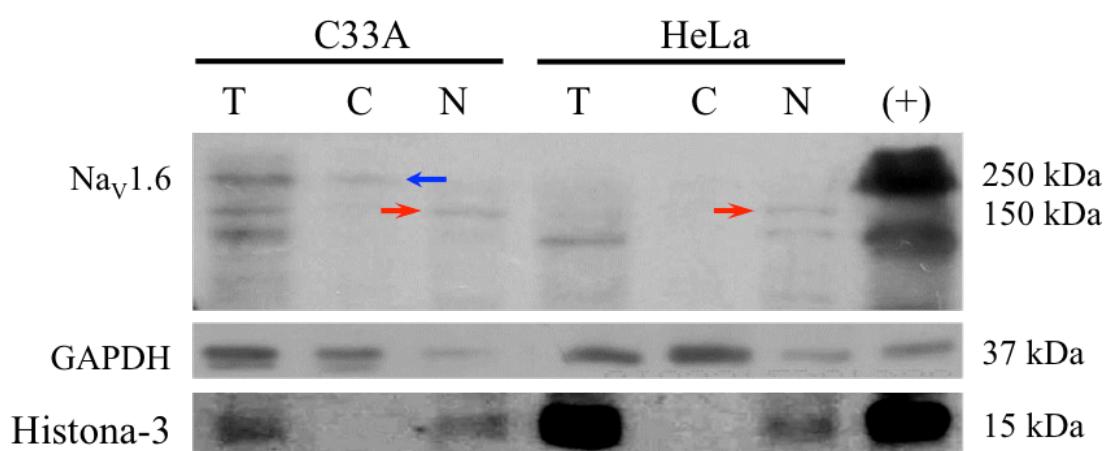


Figura 26. Identificación de la proteína de $\text{Na}_\text{V}1.6$ en fracciones celulares de las líneas de cáncer cervicouterino. Análisis por Western blot de la proteína de $\text{Na}_\text{V}1.6$ en las fracciones celulares citoplasmáticas (C) y nucleares (N), así como en los extractos totales (T) de las líneas celulares de cáncer cervicouterino. Las proteínas histona-3 y GAPDH fueron usadas como control de enriquecimiento. Resultado representativo de tres experimentos independientes. Note

que una proteína reactiva al anti- $\text{Na}_V1.6$ de un peso molecular aproximado de 150 kDa fue identificada en las fracciones nucleares de las células de CaCu. La proteína completa (250 kDa) de $\text{Na}_V1.6$ fue identificada únicamente en la fracción citoplasmática y el extracto total de las células C33A.

Expresión diferencial de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A* en biopsias y líneas celulares de cáncer cervicouterino

Con la finalidad de profundizar en el estudio de la posible expresión de distintas isoformas del gen *SCN8A* en cáncer cervicouterino, decidimos realizar experimentos de PCR estándar dirigidos a explorar las variantes generadas por procesamiento alternativo del RNA o *splicing*. En la literatura esta reportado que el procesamiento del gen *SCN8A* genera tres diferentes variantes por *splicing* del exón 18 (**Fig. 27A**), el cual codifica para los segmentos transmembrana S3 y S4 en el dominio III de los canales $\text{Na}_V1.6$ [62]. La versión de la proteína completa de un peso molecular aproximado de 250 kDa es denominada como la variante adulta (18A), la cual es funcionalmente expresada en las membranas de la mayoría de las neuronas [63]; el transcripto neonatal (18N) predice una proteína trunca de únicamente dos dominios de alrededor de 1282 aminoácidos y con un peso molecular predicho de 145 kDa, la cual no expresa corrientes de sodio [64, 65]. La tercer variante es designada como $\Delta 18$, este transcripto mantiene un marco de lectura abierto pero carece de la región que codifica para los segmentos S3 y S4 del dominio III. La expresión de esta variante parece ser limitada a compartimentos vesiculares intracelulares que participan en la invasión celular de macrófagos y células de melanoma [43]. Por lo tanto, la banda de 150 kDa detectada en las células HeLa podría corresponder a la variante 18N del canal $\text{Na}_V1.6$ y podría explicar las ausencia de corrientes de sodio en la membrana plasmática de las células de CaCu. Con el fin de explorar esta posibilidad, evaluamos la presencia de estas variantes del exón 18 del gen *SCN8A* mediante experimentos de PCR estándar en biopsias de cérvix no canceroso, neoplasias y cáncer cervicouterino, así como en las líneas celulares de CaCu. Para los

experimentos de PCR usamos oligonucleótidos que flanquean al exón 18 del gen *SCN8A* para amplificar las variantes 18A, 18N y Δ18 con tamaños moleculares predichos de 367, 314 y 244 pares de bases (pb), respectivamente. Nuevamente, células HEK-293 que expresan establemente la forma adulta (18A) del canal Nav1.6 fueron usadas como control positivo para estos experimentos. Los resultados obtenidos muestran que las isoformas 18N y Δ18 del gen *SCN8A* fueron consistentemente amplificados a partir de todos los grupos de muestras estudiados aquí, aunque, dichos productos fueron claramente más abundantes de las muestras de cáncer cervicouterino independientemente del tipo de VPH oncogénico presente en las muestras (Fig. 27).

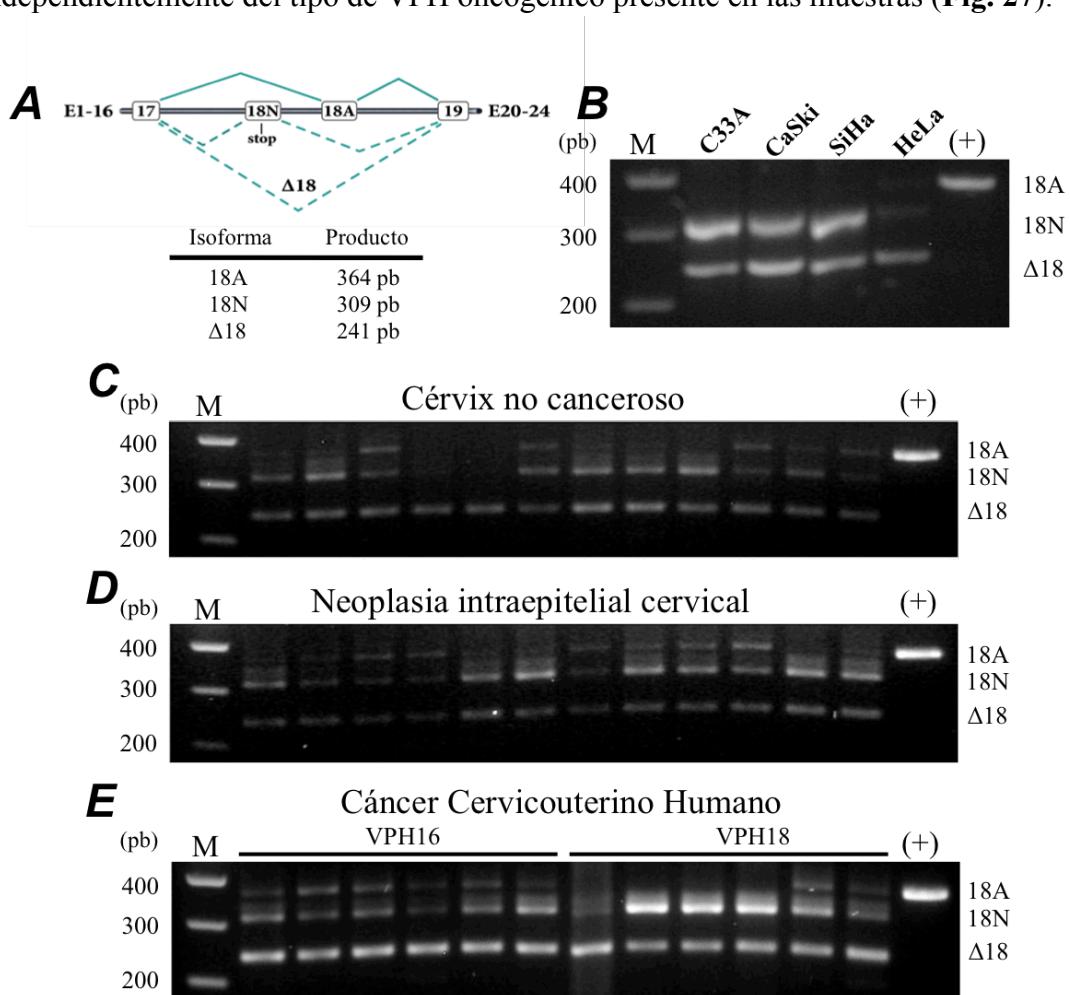


Figura 27. Procesamiento alternativo del exón 18 del gen *SCN8A* en la secuencia neoplasia-carcinoma del tejido de cérvix humano y líneas celulares de cáncer cervicouterino. A, el diagrama representa la estructura genómica expandida desde el exón 17 al 19 del gen *SCN8A* con la finalidad de ilustrar el procesamiento alternativo del exón 18. El exón 18N contiene un codón de paro prematuro en el marco de lectura. Las variantes generadas por

splicing del exón 18 están indicadas con la longitud de los productos de PCR esperados. Las fotografías de geles de agarosa muestran los productos de PCR de punto final de las líneas celulares de cáncer de cérvix (**B**), así como de muestras de cérvix no canceroso (**C**), neoplasias (**D**) y cáncer cervicouterino (**E**). Células HEK293 que expresan establemente al canal Nav1.6 fueron usadas como control positivo para la variante adulta del gen *SCN8A* (carril extremo derecho). Marcador molecular de 100 pb (carril extremo izquierdo). Las variantes del gen *SCN8A* generadas por *splicing* del exón 18: 18A, 18N y Δ18 fueron identificadas en cada grupo de muestras. La identidad de cada variante fue confirmada por secuenciación automática. Las variantes del gen *SCN8A* fueron relativamente más abundantes en las muestras de cáncer cervicouterino humano, principalmente para la variante Δ18, mientras que la variante adulta (18A) prácticamente no se encontró en las líneas celulares de cáncer cervicouterino.

Por otra parte, la variante adulta (18A) fue encontrada en el 58% de las muestras de cérvix no canceroso, en el 75% de las muestras de neoplasia, y en el 100% de las muestras de cáncer cervicouterino positivo para VPH16. Interesantemente, sólo el 33% de las muestras de cáncer cervicouterino positivas a VPH18 expresaron la isoforma 18A. Adicionalmente, las líneas celulares de cáncer cervicouterino expresaron predominantemente las isoformas 18N y Δ18 del gen *SCN8A*, mientras que la isoforma adulta está prácticamente ausente en las células C33A, SiHa, CaSki y HeLa. En resumen, la ausencia de corrientes de sodio activadas por voltaje en las líneas celulares de cáncer cervicouterino, en particular aquellas generadas por los canales Nav1.6 podría ser debida a la expresión preferencial de las isoformas 18N y Δ18 (no funcional en la membrana plasmática), sobre la expresión de la variante adulta (18A), que es la única isoforma que genera corrientes de sodio desde la membrana plasmática de las células.

Expresión heteróloga de los canales Nav1.6 incrementa la capacidad invasiva de las células de cáncer cervicouterino

Debido a la ausencia de corrientes macroscópicas de sodio en las líneas celulares de cáncer cervicouterino, decidimos realizar transfecciones transitorias para sobre expresar

el canal $\text{Na}_V1.6$ en dichas células con el fin de evaluar su expresión funcional y su participación en el comportamiento metastásico del cáncer de cérvix.

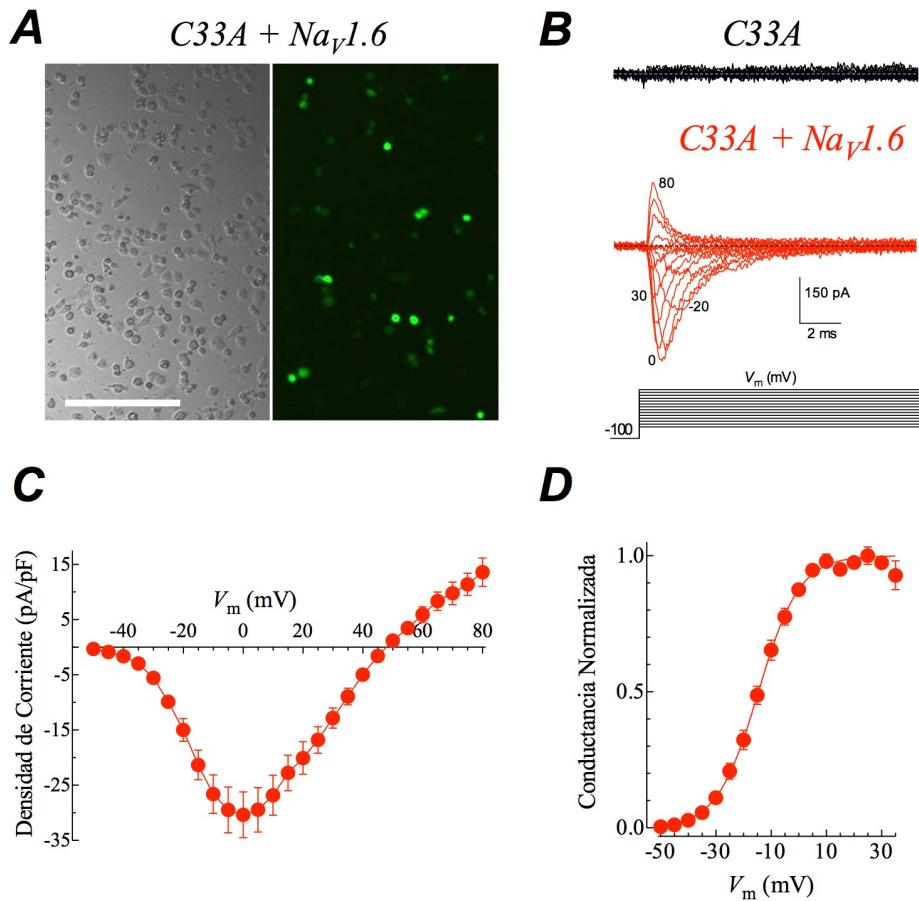


Figura 28. Expresión heteróloga del canal $\text{Na}_V1.6$ en células de cáncer cervicouterino. **A**, Imágenes representativas de contraste de fases y microscopía fluorescente de las células C33A después de 36 h desde la transfección con los plásmidos que codifican para el canal $\text{Na}_V1.6$ y para la proteína GFP. **B**, Familias de corrientes de sodio representativas obtenidas a partir de células C33A no transfectadas (trazos negros) y transfectadas (trazos rojos) con el canal $\text{Na}_V1.6$ en respuesta a pulsos despolarizantes de 16 ms desde -80 hasta $+80$ mV aplicados cada 10 seg desde un potencial de mantenimiento de -100 mV. Las líneas punteadas indican la línea basal (corriente igual a cero). **C**, Relación corriente-voltaje para los canales $\text{Na}_V1.6$ expresados de manera heteróloga en las células C33A. Los picos de corriente de sodio fueron promediados y graficados como una función del pulso despolarizante (V_m). **D**, conductancia de activación normalizada para el ion Na^+ de las mismas células mostradas en **C**. La línea continua es el ajuste con una función de Boltzmann (ver métodos) con los siguientes parámetros: $V_{1/2} = -12.2 \pm 1.2$ mV y $k = 9.7 \pm 1.0$ mV; $n = 9$ células.

La eficiencia de transfección fue alrededor del 50-60% para C33A y 30-35% para SiHa y HeLa. Las células C33A transfectadas con el canal $\text{Na}_V1.6$ generan una corriente de sodio robusta en comparación con las células no transfectadas (Fig. 28B). Además, la

relación corriente-voltaje ($I-V$) y la conductancia de activación para los canales $\text{Na}_V1.6$ expresados de manera heteróloga fueron similares a aquellas previamente reportados por nuestro grupo en células primarias derivadas de cáncer cervicouterino [44], así como en otros reportes en neuronas y células HEK-293 [63, 66], incluida la alta sensibilidad a la TTX de estos canales (Fig. 29).

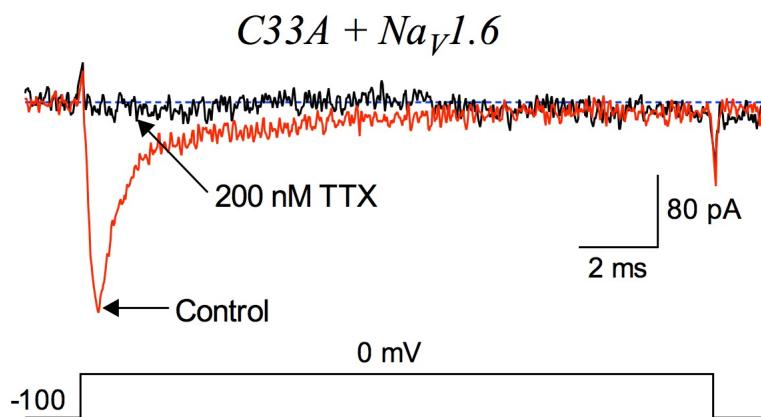


Figura 29. Naturaleza TTX-sensibles de los canales $\text{Na}_V1.6$ expresados de manera heteróloga en las células C33A. Trazos representativos de corrientes de sodio registradas en la configuración de célula completa a 0 mV en ausencia (control) y en presencia de TTX (200 nM TTX). El bloqueo completo de la corriente de sodio con esta concentración de TTX corresponde con la alta sensibilidad hacia la TTX reportada previamente para los canales $\text{Na}_V1.6$.

Con el fin de evaluar la participación de los canales $\text{Na}_V1.6$ en el comportamiento metastásico de las células C33A, realizamos ensayos de invasividad *in vitro* usando cámaras de matrigel. Los resultados indican que la invasividad celular de las células transfectadas se incrementó de manera significativa (aproximadamente 5 veces) comparado con la condición control; efecto que fue prevenido por la adición de 1 μM de TTX al medio de cultivo (Fig. 30). Estos resultados apoyan nuestras observaciones previas respecto a la contribución de los canales $\text{Na}_V1.6$ a la capacidad invasiva de células primarias de cáncer cervicouterino [45] y además demuestran que la expresión

heteróloga de los canales $\text{Na}_v1.6$ es suficiente para promover la capacidad invasiva sensible a TTX de una línea celular de CaCu positiva al VPH16 [67].

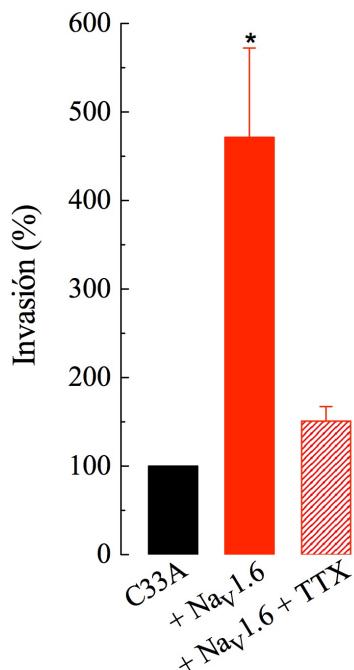


Figura 30. La sobre expresión de los canales $\text{Na}_v1.6$ incrementa la capacidad invasiva de las células C33A. La expresión heteróloga de los canales $\text{Na}_v1.6$ incrementa la capacidad invasiva de las células C33A, la cual es prevenida por la adición de 1 μM de TTX al medio de cultivo. Las columnas representan el promedio \pm DE de tres experimentos independientes. * Estadísticamente diferente de la condición control ($P < 0.05$).

Adicionalmente, nos preguntamos si la sobre expresión de los canales $\text{Na}_v1.6$ en las células de cáncer cervicouterino modificaba la proliferación celular. Para ello utilizamos el método colorimétrico de MTT previamente descrito en la sección de métodos. Los resultados indican que la expresión de los canales $\text{Na}_v1.6$ en las células de cáncer cervicouterino C33A, SiHa y HeLa no modifica significativamente la replicación celular en una ventana de tiempo de 96 h de exploración (Fig. 31).

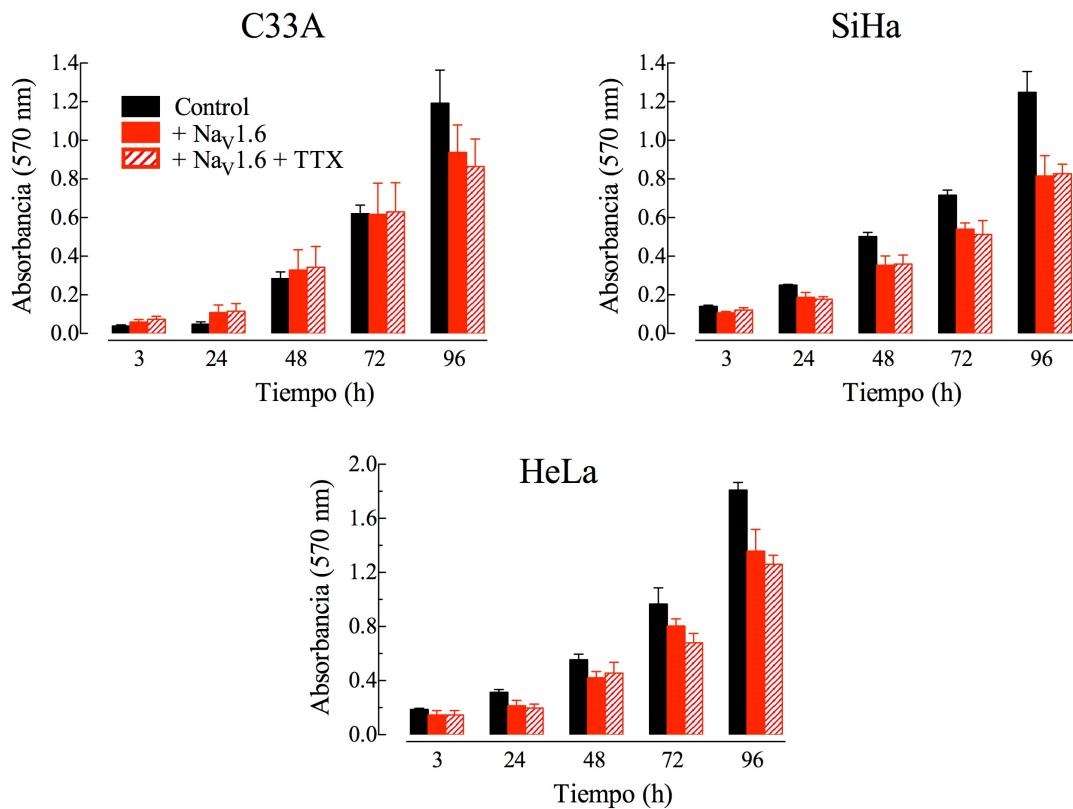


Figura 31. La proliferación de las líneas celulares de CaCu no es afectada por la sobre expresión de los canales Na_V1.6. Las células C33A, SiHa y HeLa fueron transfectadas con el plásmido para Nav1.6 y sembradas en placas de 48 pozos a una densidad de 5×10^3 células/pozo e incubadas en ausencia o presencia de 1 μM de TTX. Para cada punto experimental, las células fueron incubadas en el reactivo MTT durante 3 h y después la absorbancia fue medida a 570 nm usando DMSO como blanco. Los resultados están dados como el valor promedio \pm EE. Las diferencias entre las condiciones experimentales no fueron significativas.

Por otra parte, también nos interesó investigar si la sobre expresión de los canales Na_V1.6 modifica la migración celular de las células de CaCu. Para responder a esta interrogante, las células de cáncer cervicouterino C33A, SiHa y HeLa transfectadas transitoriamente con el canal Nav1.6 fueron sometidas al ensayo de herida en monocapa (**Fig. 13**) en ausencia y presencia de 1 μM de TTX. Los resultados obtenidos indican que la sobre expresión de los canales Na_V1.6 en las líneas celulares de cáncer cervicouterino no modifican substancialmente la migración celular (**Fig. 32**).

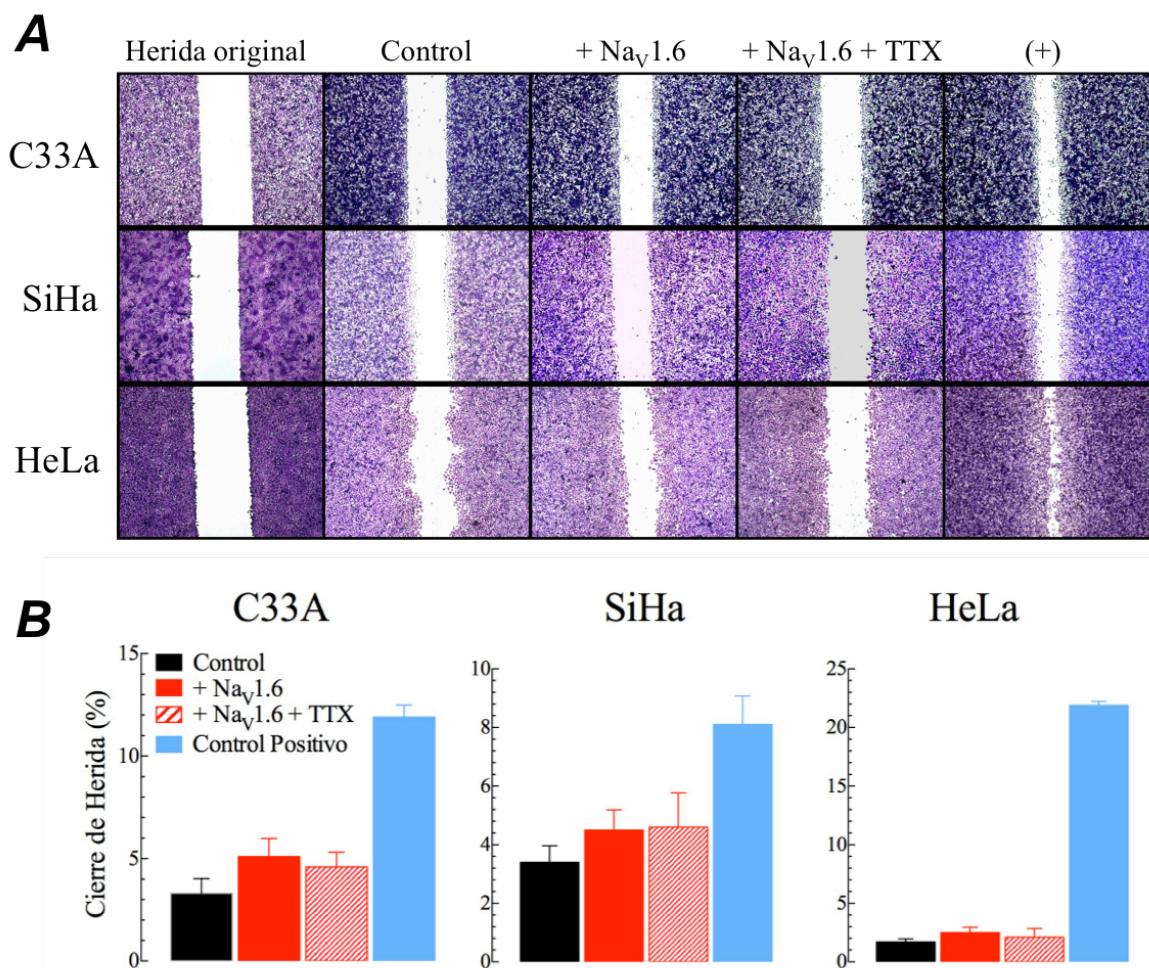


Figura 32. La migración de las líneas celulares de CaCu no es afectada por la sobre expresión de los canales Na_V1.6. *A*, Las células C33A, SiHa y HeLa fueron transfectadas con el plásmido para Na_V1.6, crecidas en cajas de 35 mm e incubadas con 12 µM de mitomicina C por 2 h. La herida fue realizada en las monocapas celulares con la ayuda de una punta de plástico de 10 µl, las células desprendidas fueron lavadas y removidas con PBS y las heridas fueron incubadas en medio de cultivo bajo en suero (+Na_V1.6) o en presencia de 1 µM de TTX (+Na_V1.6+TTX). La migración celular hacia el interior de la herida fue evaluada por la toma de microfotografías 48 h después de iniciado el experimento. La columna control representa la condición de transfección Mock. Medio de cultivo con alto contenido de SFB fue usado como control positivo. *B*, cuantificación del cierre de la herida relativo al total del área de la herida original. Las columnas indican los valores promedios ± EE. No se encontraron diferencias significativas entre condiciones experimentales. Para todas las líneas celulares de CaCu la incubación en medio de cultivo con alto contenido de SFB resultó en la mayor tasa de migración celular (columnas azules).

Estos resultados en su conjunto indican que la sobre expresión de los canales Na_V1.6 en las líneas celulares de cáncer cervicouterino no modifican la proliferación ni la

migración celular, sugiriendo que la contribución de los canales Nav1.6 a este tipo de cáncer está principalmente asociada a la invasividad celular.

La expresión funcional de los canales Nav1.6 incrementa la secreción específica y actividad de la metaloproteinasa de matriz tipo 2

Es bien conocido que la matriz extracelular es remodelada por la actividad de diferentes proteasas, tales como las metaloproteininas de matriz extracelular (MMP), las cuales juegan un papel importante en la capacidad invasiva de las células de cáncer. Por lo tanto, en esta etapa del estudio, nos preguntamos si la expresión heteróloga de los canales Nav1.6 en células de cáncer de cérvix induce la secreción y actividad de gelatinasas asociadas a la invasividad celular de este carcinoma, es decir, la MMP-2 y la MMP-9. Para responder esta interrogante realizamos experimentos de zimografía de gelatina y ensayos de Western blot a partir de cultivos de las líneas celulares de cáncer cervicouterino. En primer lugar, determinamos la actividad proteolítica basal y la expresión de las proteínas de MMP-2 y MMP-9 en sobrenadantes de células C33A, SiHa y HeLa incubadas en medio de cultivo completo (10% SFB) o sometidas a un ayuno de 24 y 48 h (**Fig. 33**). Los resultados indicaron una robusta actividad proteolítica de la MMP-2 y la MMP-9 cuando las células de CaCu fueron incubadas en medio completo (**Fig. 33**). Por el contrario, la actividad de las MMPs no fue detectada cuando las células de CaCu fueron incubadas en medio de cultivo condicionado (sin SFB). Además, las proteínas de MMP-2 y MMP-9 fueron detectadas únicamente en los sobrenadantes provenientes de la condición Control de los cultivos de líneas celulares de CaCu (**Fig. 33**).

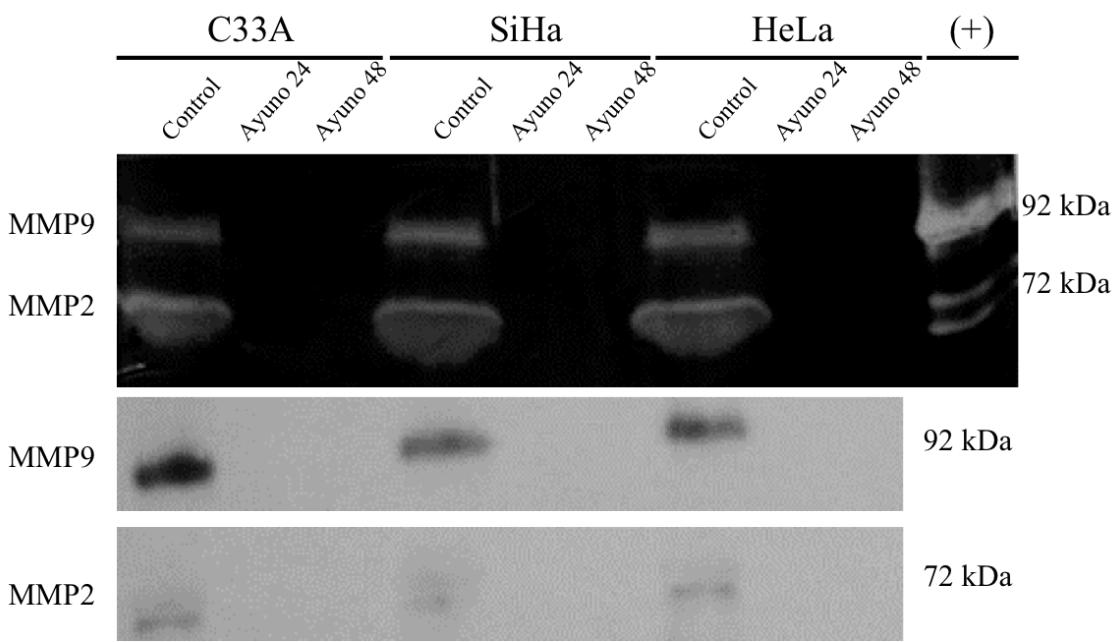


Figura 33. El medio de cultivo sin SFB disminuye la actividad basal de la MMP-2 y la MMP-9. Zimografía de gelatina para medios de cultivo obtenidos a partir de cultivos celulares de las líneas de CaCu incubadas en presencia (Control) o en ausencia de SFB (Ayuno). Las células C33A, SiHa y HeLa fueron crecidas en el medio correspondiente durante 24 y 48 h. Los medios fueron recuperados de los cultivos celulares y concentrados por centrifugación. La actividad de las gelatinas MMP-2 y MMP-9 fueron analizadas en volúmenes iguales de cada muestra mediante electroforesis en geles de poliacrilamida co-polimerizada con gelatina como substrato. Posteriormente, los geles fueron lavados e incubados en un buffer de actividad y teñidos con azul de Coomassie. Un medio condicionado obtenido a partir de células MCF-7 tratadas con 100 ng/ml de PDB durante 40 h fue usado como control positivo. La actividad proteolítica fue detectada como bandas claras contrastadas con un fondo oscuro correspondiente al substrato no digerido (panel superior). Note que las células de cáncer de cérvix que fueron crecidas en medio Control mostraron una alta actividad proteolítica de las proteasas MMP-2 y MMP-9, mientras que aquellas crecidas en el medio condicionado (Ayuno) no mostraron actividad proteolítica a las 24 ni a las 48 h de ayuno. Los experimentos de Western blot fueron realizados a partir de las mismas muestras de medios concentrados (panel inferior). Los resultados indican que las bandas correspondientes a la MMP-2 y la MMP-9 fueron identificadas en el medio Control, pero no en los medios condicionados, independientemente del tiempo de ayuno. Resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Posteriormente, procedimos a examinar el efecto de sobre expresar los canales Nav1.6 en las líneas celulares de CaCu en la expresión y actividad proteolítica de la MMP-2 y la MMP-9 cuando los niveles basales de estas proteasas son nulos, es decir, bajo la incubación en medio condicionado (sin SFB) a un tiempo de 48 h. Así, las células C33A, SiHa y HeLa transfectadas con el canal Nav1.6 fueron incubadas en medio condicionado durante 48 h. Después de transcurrido el tiempo de incubación, el medio fue recuperado y las células fueron lisadas para obtener extractos de proteína total. La secreción y actividad de la MMP-2 y MMP-9 fueron analizadas mediante zimografía con substrato de gelatina, mientras que los experimentos de Western blot dirigidos para las proteínas GAPDH y HSC70 fueron realizados para obtener un control de carga de cada condición experimental. Con este abordaje se logró evidenciar la secreción y actividad de la MMP-2 en las tres líneas celulares de CaCu, sin importar si son o no positivas a algún tipo de VPH. No obstante, los resultados sugieren diferencias en la actividad secretora entre cada línea celular (**Fig. 34**). Por ejemplo, las células SiHa (VPH16) mostraron una actividad de la MMP-2 más robusta comparada con las células HeLa (VPH18) o C33A (negativa a VPH). Independientemente de la magnitud de actividad proteolítica, los resultados indican que la actividad de la MMP-2 fue significativamente incrementada cuando las células fueron transfectadas con el canal Nav1.6 y dicho incremento en la actividad proteolítica de la MMP-2 fue parcialmente prevenida por la adición de 1 μ M TTX (**Fig. 34A y 34B**). Por el contrario, la secreción y actividad de la proteasa MMP-9 fue solamente observada en las células C33A sin cambios evidentes entre tratamientos (**Fig. 34A**).

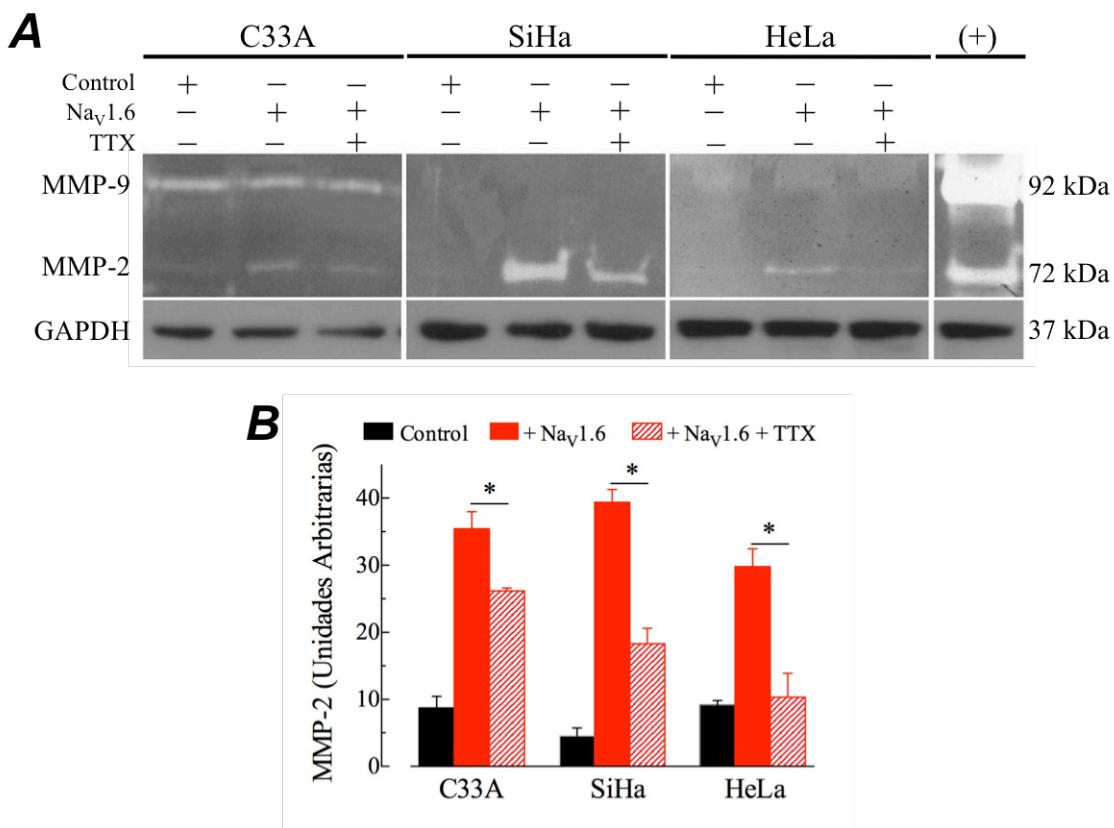


Figura 34. La actividad de los canales Na_V1.6 induce la secreción de la MMP-2 en líneas celulares de cáncer de cérvix. A, zimografía con substrato de gelatina para medios condicionados recuperados de cultivos de líneas celulares de cáncer de cérvix. Las células C33A, SiHa y HeLa fueron transfectadas con el canal Na_V1.6 y crecidas durante 24 h en ausencia o presencia de 1 µM de TTX. Los medios condicionados fueron obtenidos y las células fueron lisadas para la extracción de proteínas. La actividad proteolítica de las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 fue analizada en volúmenes iguales de medio condicionado concentrado mediante la electroforesis en geles de acrilamida co-polimerizados con gelatina como substrato y la subsecuente incubación de los geles en un buffer de actividad y la tinción con azul de Coomassie. Un medio condicionado obtenido a partir de células MCF-7 tratadas con 100 ng/ml de PDB durante 40 h fue usado como control positivo. La actividad proteolítica fue detectada como bandas claras contrastadas con un fondo oscuro correspondiente al substrato no digerido (panel superior). Los extractos de proteína total fueron analizados por Western blot para explorar la proteína GAPDH como un control de carga (panel inferior). B, la secreción de la MMP-2 fue cuantificada por densitometría usando las bandas correspondientes a la proteína GAPDH para normalizar los valores. Los resultados son presentados como la cantidad de degradación de gelatina mostradas como las bandas claras de los zimogramas relativa a las bandas de GAPDH para cada condición. Las columnas representan el valor promedio ± DE. Resultados representativos de tres experimentos independientes. *Diferencias significativas con $P < 0.05$.

Estos resultados sugieren un potencial papel de la MMP-2 en la capacidad invasiva de las células de CaCu mediada por los canales Na_V1.6, por lo tanto, el siguiente paso consistió en investigar los niveles de expresión de esta metaloproteinasa en el tejido de

cérvix no canceroso, así como en el de cáncer cervicouterino. Los resultados de Western blot muestran que la proteína de la MMP-2 se expresa en ambos tejidos (**Fig. 35**), no obstante, la expresión relativa de la proteína MMP-2 fue dos veces más abundante en las muestras de cáncer cervicouterino (**Fig. 35B**).

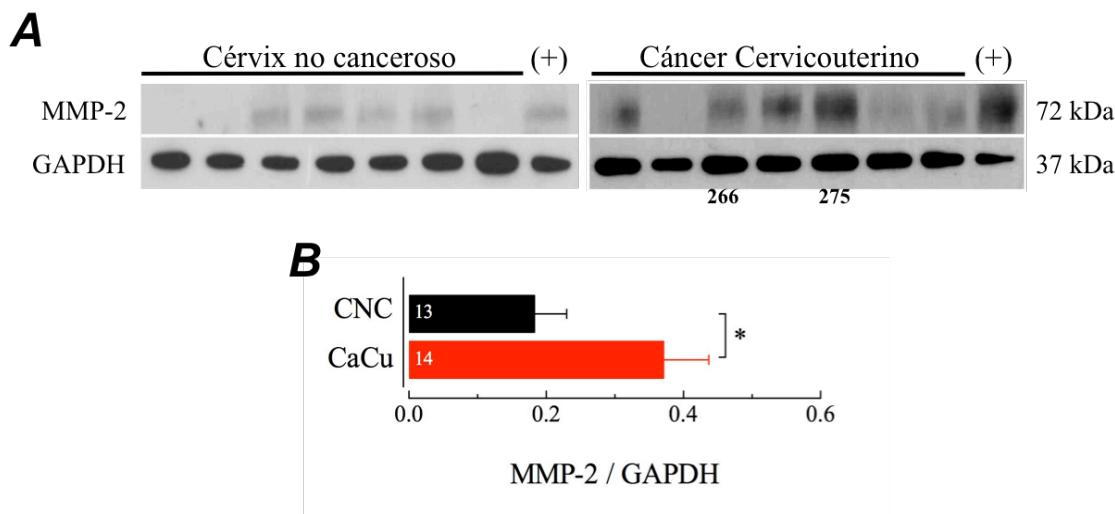


Figura 35. Expresión de la proteína de MMP-2 en tejido humano de cérvix no canceroso y cáncer cervicouterino. **A**, resultados representativos de Western blot para la proteasa MMP-2 expresada en biopsias de cérvix humano, cérvix no canceroso y cáncer cervicouterino. **B**, el análisis de expresión relativa por densitometría muestra que la MMP-2 es dos veces más abundante en el cáncer cervicouterino. *Diferencias estadísticas a un valor de $P < 0.05$.

Por otra parte, es bien conocido que el intercambiador Na^+/H^+ tipo 1 (NHE-1), un regulador del pH intracelular, es esencial para la capacidad invasiva tumoral [37, 68, 69], y que su función juega un papel importante en la acidificación necesaria para la activación de proteasas [69-71]. Por lo anterior, decidimos evaluar la presencia de la proteína NHE-1 en las mismas muestras donde observamos la sobre expresión de la metaloproteinasa de matriz tipo 2. Los resultados de Western blot demuestran la presencia de la proteína de NHE-1 en 4 de 13 (31%) biopsias de cérvix no canceroso y en 9 de 14 (64%) de las biopsias de cáncer cervicouterino (**Fig. 36**). El análisis de la expresión relativa de la proteína de NHE-1 sugiere un incremento en la expresión de la proteína de aproximadamente tres veces en biopsias de cáncer cervicouterino comparado con el cérvix no canceroso (**Fig. 36B**).

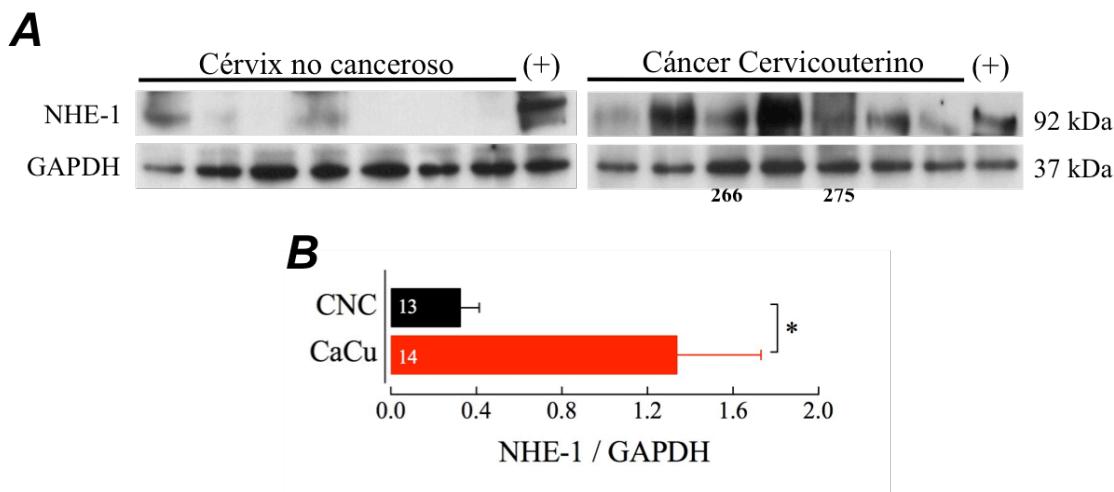


Figura 36. Expresión de la proteína de NHE-1 en tejido humano de cérvix no canceroso y cáncer cervicouterino. *A*, resultados representativos de Western blot para la proteína NHE-1 expresada en biopsias de cérvix humano: cérvix no canceroso y cáncer cervicouterino. *B*, el análisis de expresión relativa por densitometría muestra que la proteína de NHE-1 es tres veces más abundante en el cáncer cervicouterino. *Diferencias significativas ($P < 0.05$).

Adicionalmente, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de tipo 1 (NCX-1) es una proteína de la membrana plasmática que se expresa ubícuamente en las células de mamífero, y cuya función consiste en transportar iones Ca^{2+} desde el citoplasma hasta el espacio extracelular usando el gradiente electroquímico del Na^+ . Interesantemente, la actividad reversa de este transportador (es decir, introducir Ca^{2+} al citoplasma a expensas de transportar Na^+ al espacio extracelular), está principalmente asociada a condiciones patológicas de las células como el cáncer [72]. Así, en nuestro estudio, investigamos la expresión de la proteína del NCX-1 mediante experimentos de Western blot. Los resultados indican que la expresión de la proteína NCX-1 fue aproximadamente tres veces más abundante en las muestras de cáncer cervicouterino comparadas con el cérvix no canceroso (Fig. 37).

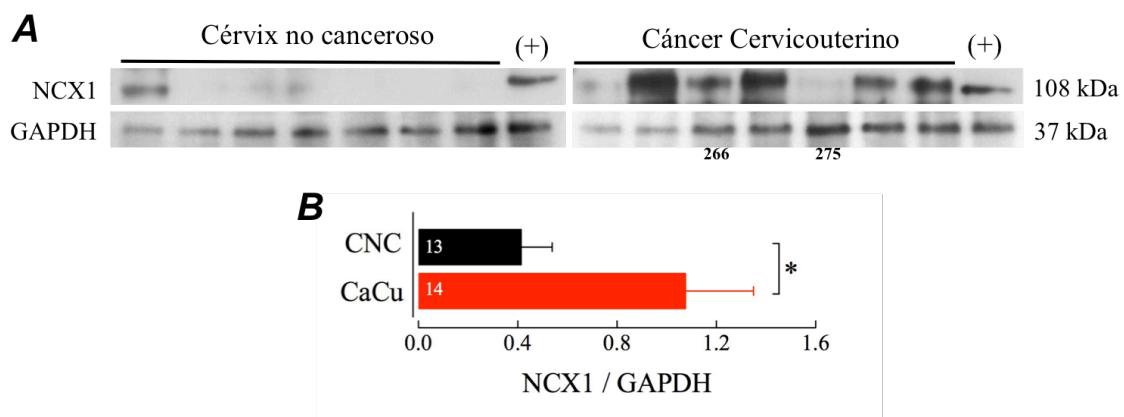


Figura 37. Expresión de la proteína de NCX-1 en tejido humano de cérvix no canceroso y cáncer cervicouterino. *A*, resultados representativos de Western blot para la proteína NCX-1 expresada en biopsias de cérvix no canceroso y cáncer cervicouterino. *B*, el análisis de expresión relativa por densitometría muestra que la proteína de NCX-1 es aproximadamente tres veces más abundante en el cáncer cervicouterino. *Diferencias significativas ($P < 0.05$).

Finalmente, con el propósito de obtener evidencias adicionales acerca de la contribución de la MMP-2 a la capacidad invasiva de las células de CaCu promovida por la actividad del canal Nav1.6, decidimos explorar al participación en este fenómeno de otras clases de proteasas, adicionales a la familia de las MMPs, que también están involucradas en la degradación de la matriz extracelular promoviendo la invasividad celular y la progresión del cáncer [21, 73]. Para abordar esta pregunta realizamos ensayos de invasión en células C33A transfectadas con los canales Nav1.6 en presencia de inhibidores farmacológicos de diferentes clases de proteasas incluidas las catepsinas de cisteína (E-64), las peptidasas de serina y treonina (Leupeptina), así como de las MMPs en general (GM6001). Los resultados obtenidos sugieren que la invasividad de las células C33A promovida por Nav1.6 podría ser debida específicamente a la actividad de las MMPs, ya que dicha capacidad invasiva fue atenuada significativamente únicamente

en presencia del inhibidor GM6001, un inhibidor de amplio espectro de las MMPs (**Fig. 38**).

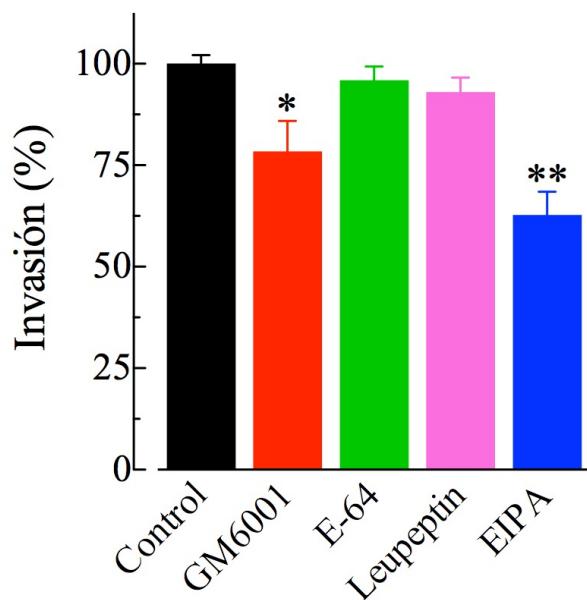


Figura 38. Efecto de los inhibidores de proteasas y el inhibidor del NHE-1 en la capacidad invasiva de las células C33A transfectadas con el canal $\text{Na}_v1.6$. Células C33A transfectadas con los canales $\text{Na}_v1.6$ fueron sembradas a una densidad celular de 6×10^4 células/inserto con un gradiente de SFB de 10% en ausencia (Control) y en presencia de inhibidores de distintas clases de proteasas. GM6001 25 μM (MMPs), E-64 100 μM (Catepsinas de cisteína) y Leupeptin 100 μM (peptidasas de serina y treonina). Adicionalmente, una condición con el inhibidor específico del transportador NHE-1 fue incluida (EIPA 1 μM). Después de 48 h, los núcleos de las células invasivas fueron marcados con DAPI y contados automáticamente. Los resultados corresponden a seis observaciones experimentales de dos experimentos independientes y son expresados como invasión relativa (promedio \pm DE), normalizada a la condición control. *Diferencias estadísticas con $P < 0.05$. **Diferencia estadística con $P < 0.01$.

Interesantemente, la capacidad invasiva de las células C33A transfectadas con los canales $\text{Na}_v1.6$ fue importantemente atenuada por la presencia del fármaco EIPA (**Fig. 38**), un inhibidor específico del intercambiador NHE-1, confirmando la participación de la proteína NHE-1 en la acidificación del espacio extracelular requerido para la actividad de las MMPs.

La ultima serie de experimentos del presente trabajo de tesis se enfocó en obtener evidencias acerca del mecanismo por el cual la actividad de los canales $\text{Na}_v1.6$ modula

la actividad de la MMP-2, para lo cual nos propusimos explorar los niveles de expresión de la forma inmadura (pro-MMP2) y madura (MMP-2) de esta metaloproteína en los sobrenadantes de cultivos celulares de células C33A transfectadas con los canales $\text{Na}_v1.6$ en ausencia y presencia de 1 μM de TTX. Así, los medios de cultivo fueron recuperados y concentrados por centrifugación. La presencia de la forma inmadura y madura de la MMP-2 fue explorada en volúmenes iguales de medio condicionado mediante experimentos de Western blot. La proteína HSC70 fu usada como control de carga. Los resultados obtenidos indican que la sobre expresión de los canales $\text{Na}_v1.6$ en las células C33A induce un robusto incremento de la pro-MMP-2 (alrededor de 7 veces) y de la forma madura de MMP-2 (alrededor de 4 veces) comparados con la condición control. Estos incrementos en ambas formas de la MMP-2 fueron prevenidos por la presencia de 1 μM TTX en los medios de cultivo (**Fig. 39**).

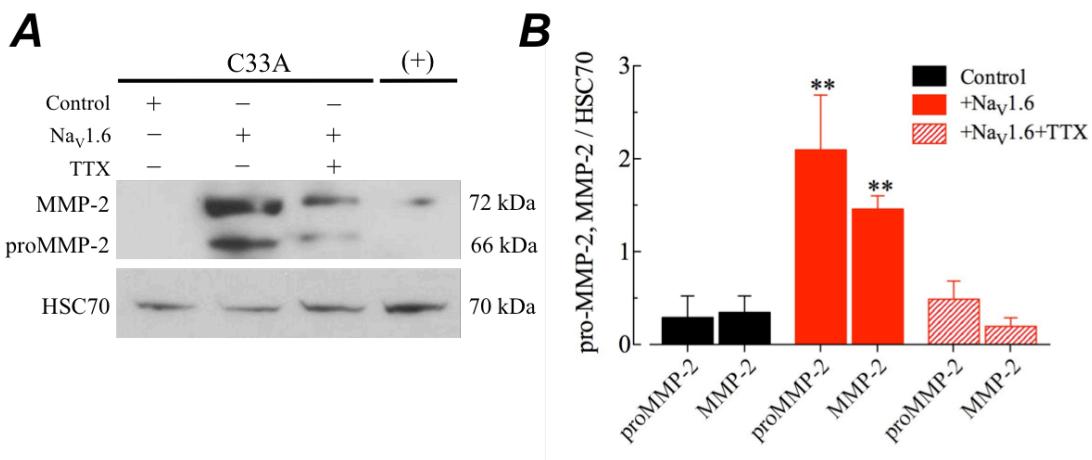


Figura 39. La expresión de los canales $\text{Na}_v1.6$ en las células C33A induce la secreción de la pro-MMP-2 y la forma madura de MMP-2. **A**, Experimentos representativos de Western blot para el análisis de la expresión de la forma inmadura y madura de la MMP-2 en los sobrenadantes de las células C33A. Los medios condicionados de cultivos de células C33A transfectadas con los canales $\text{Na}_v1.6$ e incubados en ausencia o presencia de 1 μM de TTX fueron recuperados después de 48 h y concentrados por centrifugación. La proteína HSC70 fue usada como control de carga. Sobrenadantes provenientes de cultivos de células C33A en medio completo (10% de SFB) fueron usados como control positivo. **B**, la cuantificación de la expresión de la pro-MMP-2 y la forma madura de MMP-2 fue realizada mediante densitometría de las imágenes de Western blot. Los resultados se presentan como la cantidad de las formas pro-MMP2 y MMP-2 madura relativas a la expresión de la proteína HSC70. Las barras representan el valor promedio \pm DE de tres experimentos independientes. *Diferencias estadísticas respecto al control ($P < 0.01$).

DISCUSIÓN

Durante las últimas dos décadas se han evidenciado nuevas funciones no-canónicas de los canales de sodio activados por voltaje, es decir, la actividad de la proteína del canal que no esta asociada a la generación y propagación de potenciales de acción. La actividad no canónica de los canales Nav esta principalmente relacionada con un comportamiento metastásico de las células de cáncer de distinto origen [21, 73]. Nuestro grupo de trabajo, previamente ha demostrado que los canales Nav1.6 juegan un papel importante en la capacidad invasiva de células primarias de cáncer cervicouterino. A pesar de que varias subunidades α de los canales Nav son expresadas en biopsias y cultivos primarios de cáncer cervicouterino, únicamente el mRNA que codifica para el canal Nav1.6 es sobreexpresado alrededor de 40 veces en comparación con el cérvix no canceroso [44, 45]. La inhibición de la actividad de los canales Nav1.6 resulta en una sustancial disminución de la capacidad invasiva de células primarias de CaCu, sin afectar la proliferación ni la migración celular [45]. Todas nuestras evidencias al respecto fueron obtenidas usando biopsias y cultivos primarios de CaCu positivas al VPH tipo 16, el tipo de VPH más frecuentemente detectado en este tipo de cáncer, con una incidencia en más del 50% de los casos. No obstante, otros tipos de VPH de alto riesgo incluidos los tipos 18, 58, 33, 45, 31, 52 y 35 contribuyen en conjunto con un 40% adicional de los casos de CaCu [2, 74]. En el presente trabajo de tesis de doctorado hemos encontrado que la sobreexpresión del gen *SCN8A* (Nav1.6) es también conservada para el cáncer cervicouterino positivo a otros tipos de VPH oncogénicos, que en conjunto con nuestras evidencias obtenidas en las muestras positivas al VPH16, nos permite concluir que la sobreexpresión del gen *SCN8A* es una característica general para el cáncer cervicouterino humano, independientemente del tipo de VPH que se encuentre presente. Adicionalmente, identificamos que el incremento en los niveles del

mRNA para el gen *SCN8A* fue también acompañado con una expresión aberrante (sobre expresión) de la proteína de los canales Nav1.6 en las biopsias de cáncer cervicouterino estudiadas aquí. Interesantemente, en el cáncer cervicouterino no sólo aumenta la expresión de la proteína del canal Nav1.6 sino también su localización intracelular se ve modificada, tal y como lo observamos en el tejido canceroso del cérvix, donde la señal para el canal Nav1.6 sugirió una distribución en los compartimentos intracelulares, mientras que en el tejido de cérvix no canceroso, la señal del canal fue claramente más abundante y limitada a la membrana plasmática de las células (**Fig. 21**). Así el gen *SCN8A* es sobre expresado en la mayoría de los casos de cáncer cervicouterino (alrededor del 90%) comparado con el cérvix no canceroso y las lesiones preneoplásicas. Adicionalmente, estos niveles aberrantes del gen *SCN8A* permiten diferenciar, con una alta especificidad y sensibilidad, los casos de cáncer cervicouterino de las muestras de cérvix no canceroso (**Fig. 19**). No obstante, se requieren estudios adicionales para considerar el uso potencial de los niveles de expresión del gen *SCN8A* como un marcador molecular con utilidad clínica para el cáncer cervicouterino.

Con el fin de incrementar nuestro conocimiento acerca de la contribución de los canales Nav1.6 a la capacidad invasiva de las células de cáncer cervicouterino [45], recurrimos al uso de líneas celulares de CaCu comercialmente disponibles, sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales y después de una exhaustiva búsqueda, no encontramos corrientes de sodio activadas por voltaje en las líneas celulares de CaCu comúnmente usadas: SiHa, HeLa y CaSki. La excepción fue el caso de las células C33A, que se caracterizan por ser negativas al VPH, en las cuales fue identificado un pequeño componente entrante característico de las corrientes de sodio activadas por voltaje (**Fig. 22**). A pesar de este hecho, nuestros experimentos de immunofluorescencia, Western blot y PCR (**Figs. 25, 26 y 27**) proporcionaron importantes evidencias para

sugerir la presencia de los canales Nav1.6 en compartimentos intracelulares en las líneas celulares de CaCu, particularmente en las células C33A, SiHa y HeLa. La localización intracelular del canal Nav1.6 ha sido previamente identificada en macrófagos y células de melanoma, donde una isoforma del canal Nav1.6 es expresada en vesículas que son distribuidas a través del citoplasma, pero no en la membrana plasmática [43]. Estos canales Nav1.6 localizados intracelularmente regulan la invasividad celular de macrófagos y células de melanoma. La isoforma del canal Nav1.6 que fue identificada en estas células corresponde a la variante de *splicing* del gen *SCN8A* que carece del exón 18, es decir la isoforma Δ18 [43]. De acuerdo con estos reportes, nuestros resultados muestran una expresión importante de la variante Δ18 del gen *SCN8A* en las líneas celulares y biopsias de cáncer cervicouterino pero no así en las muestras de cérvix no canceroso ni en aquellas provenientes de neoplasias cervicales (**Fig. 27**). Lo anterior sugiere una posible participación de esta variante en la capacidad invasiva de las células de CaCu similar a lo que sucede en células derivadas de leucemia y melanoma [43]. Esta observación podría ser una explicación parcial de la señal correspondiente al canal Nav1.6 que fue encontrada ampliamente distribuida en las células de cáncer cervicouterino comparada con una señal bien localizada en la membrana plasmática de las células de cérvix no canceroso (**Figs. 21 y 25**), ya que la variante Δ18 ha sido identificada únicamente en compartimentos intracelulares [43]. Además, esto podría explicar también la falta de corrientes de sodio desde la membrana plasmática de las líneas celulares de cáncer cervicouterino exploradas en este trabajo. En resumen, los resultados de esta sección muestran por primera vez la expresión de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A* durante la progresión del cáncer cervicouterino humano. Es importante resaltar que nuestras evidencias previas con los cultivos primarios de CaCu indican un papel de los canales Nav1.6 expresados en la membrana

plasmática, ya que el bloqueo de su actividad con la toxina de alacrán Cn2 disminuye el comportamiento invasivo de los cultivos primarios de CaCu [45]. Debido a que la toxina Cn2 no es permeable a la membrana y su mecanismo de acción consiste en modificar la activación de los canales $\text{Na}_V1.6$ por la unión a sitios específicos en la parte extracelular del canal [75, 76], el efecto descrito sobre la invasividad celular podría ser debido principalmente por la interacción con los canales $\text{Na}_V1.6$ expresados en la membrana plasmática de las células de cultivos primarios de CaCu. En el caso de la posible expresión de los canales $\text{Na}_V1.6$ en compartimentos intracelulares en las líneas celulares de cáncer cervicouterino, permanece como una tarea pendiente investigar si el canal es funcional en los compartimentos intracelulares y si a este nivel también contribuyen al comportamiento metastásico de tales líneas celulares. Además, estos resultados indican que las líneas celulares de CaCu podrían no ser completamente representativas de los cultivos primarios derivados de biopsias tumorales frescas, puesto que estos últimos si expresan corrientes de sodio activadas por voltaje desde la membrana plasmática de la célula [45], mientras que en este trabajo y bajo nuestras condiciones experimentales, las líneas celulares de CaCu carecen de este tipo de corrientes. Una probable explicación a esta discrepancia podrían ser las condiciones experimentales, por ejemplo, ha sido demostrado que una concentración de SFB en el medio de cultivo superior al 5% produce una disminución significativa en la actividad de los canales Na_V en una línea celular de cáncer de próstata [77]; las líneas celulares de CaCu que usamos en el presente estudio han sido mantenidas en medio de cultivo con 10% de SFB desde que estas fueron inmortalizadas. Por lo tanto, existe la posibilidad de que los canales Na_V de las líneas celulares de CaCu estén siendo regulados de tal manera que no se expresen funcionalmente en la membrana plasmática de estas células por efecto del SFB o algún otro factor de crecimiento extracelular usados en la continua

propagación de estas líneas celulares de cáncer. Sin embargo, esta incógnita amerita la realización de experimentos adicionales en un futuro próximo.

Por otro lado, este trabajo marca el punto de partida acerca del estudio del mecanismo subyacente en la regulación de la capacidad invasiva de células de CaCu mediada por los canales Nav1.6. Nuestros resultados indican que la expresión heteróloga de los canales Nav1.6 incrementa la capacidad invasiva de las células de cáncer cervicouterino. Además, la inhibición de la actividad de los canales Nav1.6 por el uso de TTX previene la capacidad invasiva aumentada de las células de CaCu (**Fig. 30**). Interesantemente, la sobre expresión de los canales Nav1.6 en las líneas celulares de CaCu no modifica significativamente la proliferación ni la migración de estas células (**Figs. 31 y 32**). Estos resultados son consistentes con observaciones previas de nuestro grupo y de otros sugiriendo que la actividad de los canales Nav expresados en la membrana plasmática de las células está principalmente asociada con la invasividad celular con diferentes tipos de cáncer [30-34, 36, 37, 45]. No obstante, algunos pocos estudios indican que los canales Nav también controlan la proliferación celular y la migración en astrocitoma, cáncer de próstata y cáncer gástrico [37, 78, 79]. Recientemente se demostró que el efecto pro-invasivo de los canales Nav1.5 en células de cáncer de mama es modulado en parte a través del incremento en la actividad de las metaloproteinasas de matriz o MMPs [80]. Las MMPs son proteasas secretadas que inducen la degradación de varios componentes de la membrana basal y de la matriz extracelular incluidos colágena, laminina, fibronectina, tenascina, elastina y proteoglicanos [81]. También ha sido demostrado que las MMPs juegan un papel importante en la invasión tumoral y migración celular, así como en otras propiedades de las células de cáncer [12, 82]; particularmente la MMP-2 y la MMP-9 son sobre

expresadas en varios tipos de cáncer y están asociadas a la invasividad celular y la progresión tumoral [83-85]. Los resultados del presente trabajo indican que la expresión funcional de los canales Nav1.6 en la membrana plasmática de las líneas celulares de cáncer cervicouterino incrementa tanto la actividad como la expresión de la proteína de MMP-2 de manera específica ya que la MMP-9 no mostró cambios en la actividad proteolítica (**Fig. 34**). Adicionalmente, mediante el uso de inhibidores específicos de la actividad de otras familias de proteasas (catepsinas de cisteína y las peptidasas de serina y treonina) se descartó la participación de estas clases de proteasas en la invasividad asociada a los canales Nav1.6, por lo que se puede concluir que la MMP-2 tiene una participación prácticamente exclusiva la capacidad invasiva en las células C33A promovida por la actividad funcional de los canales Nav1.6 (**Fig. 38**). Además, los análisis por Western blot de las formas inmadura (pro-MMP-2) y madura (MMP-2) de esta metaloproteinasa de matriz, permiten proponer que la actividad de los canales Nav1.6 en las células C33A promueve la secreción y la maduración (actividad) de la MMP-2 la cual dirige el incremento en la invasividad en estas células de cáncer de cérvix. A este respecto, las metaloproteinases de matriz tipo 2 (MMP-2) y tipo 9 (MMP-9) han sido identificadas en el invadopodio maduro de células de cáncer donde estas son secretadas [86] y también participan en la invasividad de las células de cáncer de colon [84]. Estudios recientes han resaltado la relevancia de la acidificación del espacio extracelular en el microambiente tumoral, lo cual favorece la capacidad invasiva y la propagación de las células cancerosas [37, 69]. En este sentido, el intercambiador NHE-1 es altamente expresado en varios tipos de cáncer y ha sido implicado como un participante esencial para la invasividad celular a través de la regulación del pH intra- y extracelular [37, 87, 88]. Además, un trabajo previo indica que la inhibición de la actividad de los canales Nav1.6 disminuye los niveles de expresión de la proteína de

NHE-1 en células de la microglia de ratón [89]. Con base en estos antecedentes, nos preguntamos si la expresión y actividad incrementada de la MMP-2 en las células y tejido de cáncer cervicouterino es acompañado por un cambio en la expresión de la proteína NHE-1. Nuestros resultados de Western blot confirman que no solamente la expresión de la proteína de NHE-1 sino también la del NCX-1 (intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) mostraron un incremento significativo en las biopsias de cáncer cervicouterino en comparación con las de CNC (**Figs. 36 y 37**). Además, la invasividad de las células C33A transfectadas con el canal $\text{Na}_v1.6$ disminuyó significativamente por la inhibición farmacológica del transportador NHE-1 (**Fig. 38**), lo cual sugiere que la acidificación de la matriz extracelular es esencial para la actividad de la MMP-2. Por lo tanto, estos resultados resaltan una posible relación entre la actividad de los canales $\text{Na}_v1.6$, la sobre expresión del transportador NHE-1 y la exacerbada actividad de la MMP-2 que podría dirigir el incremento observado en la invasividad celular de las células de cáncer de cérvix.

En resumen, los resultados presentados en este trabajo de tesis de doctorado sugieren que la desregulación del gen *SCN8A* ocurre principalmente cuando el tejido se ha transformado en cáncer y no en etapas pre-neoplásicas de este carcinoma. Asimismo, la invasividad promovida por los canales $\text{Na}_v1.6$ en el CaCu involucra la actividad específica de la MMP-2. Estos conocimientos de ciencia básica contribuyen y refuerzan la noción del uso potencial de los canales Nav como blancos terapéuticos contra el fenómeno metastásico del cáncer.

CONCLUSIONES

1. La desregulación positiva del gen *SCN8A* en el tejido de cérvix humano se presenta principalmente cuando se ha establecido el cáncer.
2. En el cáncer cervicouterino, el procesamiento alternativo del gen *SCN8A* en el exón 18 favorece la isoforma Δ18 sobre las variantes neonatal (18N) y adulta (18A).
3. La capacidad invasiva de las células de cáncer de cérvix asociada con la actividad de los canales Nav1.6 es mediada por un mecanismo que involucra la participación del intercambiador NHE-1 y la específica secreción y actividad proteolítica de la metaloproteinasa de matriz tipo 2.
4. La expresión de los canales Nav1.6 en el cáncer cervicouterino podría representar un blanco molecular para reducir la metástasis de este carcinoma.

PERSPECTIVAS

El estudio de los canales de sodio activados por voltaje en los sistemas excitables es un campo de investigación apasionante, estudiar las mismas proteínas en sistemas no canónicos como el cáncer, lo es aún más.

Los resultados de este trabajo permiten plantear diferentes preguntas para incrementar nuestro entendimiento acerca de la desregulación y participación de los canales Nav1.6 en el cáncer cervicouterino.

En primer lugar, queda como un tema pendiente explorar si las proteínas oncogénicas E6 y E7 del VPH16 (en primera instancia) regulan la expresión y actividad de los canales Nav1.6 usando para ello sistemas de expresión heteróloga. Este trabajo fue dirigido principalmente a la actividad de los canales Nav1.6 y su participación en la capacidad invasiva de las células de CaCu, pero aún resulta pertinente investigar el efecto de estas proteínas virales sobre la expresión del gen *SCN8A*.

Los resultados previos indican que los cultivos primarios y por lo tanto las células que forman parte del tumor del cáncer cervicouterino expresan corrientes de sodio desde la membrana plasmática principalmente debida a los canales Nav1.6. Por lo tanto, resulta llamativo clonar el gen *SCN8A* a partir de estas muestras, con el fin de identificar posibles mutaciones previamente reportadas que afectan la actividad del canal, así como descifrar su localización subcelular.

Como se demostró en el presente trabajo, la mayoría de las líneas celulares de CaCu no expresan corrientes de sodio desde la membrana plasmática y nuestros resultados sugieren que algunas isoformas del canal Nav1.6 son expresados en compartimentos intracelulares, por lo que surge la pregunta de investigar si el canal es funcional en dichos compartimentos intracelulares y si de esta manera contribuye al comportamiento metastásico de las células de cáncer cervicouterino.

Finalmente, una perspectiva muy atractiva es el uso de modelos animales para evaluar la participación de los canales Nav1.6 en el comportamiento metastásico de las células de cáncer cervicouterino.

REFERENCIAS

1. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(2): p. 87-108.
2. Roden, R. & T.C. Wu, *How will HPV vaccines affect cervical cancer?* Nat Rev Cancer, 2006. **6**(10): p. 753-63.
3. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2015. **136**(5): p. E359-86.
4. Subramaniam, A., et al., *Invasive cervical cancer and screening: what are the rates of unscreened and underscreened women in the modern era?* J Low Genit Tract Dis, 2011. **15**(2): p. 110-3.
5. Ostor, A.G., *Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review*. Int J Gynecol Pathol, 1993. **12**(2): p. 186-92.
6. Hanna, E. & G. Bachmann, *HPV vaccination with Gardasil: a breakthrough in women's health*. Expert Opin Biol Ther, 2006. **6**(11): p. 1223-7.
7. INSP, *Instituto Nacional de Salud Pública*, S.d. Salud, Editor. 2012: México.
8. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012*. Eur J Cancer, 2013. **49**(6): p. 1374-403.
9. McCrory, D.C., et al., *Evaluation of cervical cytology*. Evid Rep Technol Assess (Summ), 1999(5): p. 1-6.
10. Wright, T.C., Jr., *Cervical cancer screening in the 21st century: is it time to retire the PAP smear?* Clin Obstet Gynecol, 2007. **50**(2): p. 313-23.
11. Leinonen, M., et al., *Age-specific evaluation of primary human papillomavirus screening vs conventional cytology in a randomized setting*. J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(23): p. 1612-23.
12. Gialeli, C., A.D. Theocharis, & N.K. Karamanos, *Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting*. FEBS J, 2011. **278**(1): p. 16-27.
13. Rauvala, M., et al., *Matrix metalloproteinases-2 and -9 in cervical cancer: different roles in tumor progression*. Int J Gynecol Cancer, 2006. **16**(3): p. 1297-302.
14. Sheu, B.C., et al., *Increased expression and activation of gelatinolytic matrix metalloproteinases is associated with the progression and recurrence of human cervical cancer*. Cancer Res, 2003. **63**(19): p. 6537-42.
15. Page-McCaw, A., A.J. Ewald, & Z. Werb, *Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(3): p. 221-33.
16. Overall, C.M., *Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites*. Mol Biotechnol, 2002. **22**(1): p. 51-86.
17. Pruitt, K., *Molecular and Cellular Changes During Cancer Progression Resulting From Genetic and Epigenetic Alterations*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2016. **144**: p. 3-47.
18. Arcangeli, A., et al., *Targeting ion channels in cancer: a novel frontier in antineoplastic therapy*. Curr Med Chem, 2009. **16**(1): p. 66-93.
19. Hille, B., *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 2001: Sinauer Associates Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts.
20. Black, J.A. & S.G. Waxman, *Noncanonical roles of voltage-gated sodium channels*. Neuron, 2013. **80**(2): p. 280-91.

21. Roger, S., et al., *Voltage-gated sodium channels and cancer: is excitability their primary role?* Front Pharmacol, 2015. **6**: p. 152.
22. Noda, M., et al., *Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence.* Nature, 1984. **312**(5990): p. 121-7.
23. Catterall, W.A., et al., *International Union of Pharmacology. XXXIX. Compendium of voltage-gated ion channels: sodium channels.* Pharmacol Rev, 2003. **55**(4): p. 575-8.
24. Payandeh, J., et al., *The crystal structure of a voltage-gated sodium channel.* Nature, 2011. **475**(7356): p. 353-8.
25. Ren, D., et al., *A prokaryotic voltage-gated sodium channel.* Science, 2001. **294**(5550): p. 2372-5.
26. Catterall, W.A., *Molecular mechanisms of gating and drug block of sodium channels.* Novartis Found Symp, 2002. **241**: p. 206-18; discussion 218-32.
27. Lai, H.C. & L.Y. Jan, *The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels.* Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(7): p. 548-62.
28. Brackenbury, W.J. & L.L. Isom, *Na Channel beta Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family.* Front Pharmacol, 2011. **2**: p. 53.
29. Catterall, W.A., *Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology.* J Physiol, 2012. **590**(11): p. 2577-89.
30. Fraser, S.P., et al., *Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis.* Clin Cancer Res, 2005. **11**(15): p. 5381-9.
31. Fraser, S.P., et al., *T-lymphocyte invasiveness: control by voltage-gated Na⁺ channel activity.* FEBS Lett, 2004. **569**(1-3): p. 191-4.
32. Gao, R., et al., *Expression of voltage-gated sodium channel alpha subunit in human ovarian cancer.* Oncol Rep, 2010. **23**(5): p. 1293-9.
33. House, C.D., et al., *Voltage-gated Na⁺ channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion.* Cancer Res, 2010. **70**(17): p. 6957-67.
34. Laniado, M.E., et al., *Expression and functional analysis of voltage-activated Na⁺ channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion in vitro.* Am J Pathol, 1997. **150**(4): p. 1213-21.
35. Roger, S., P. Besson, & J.Y. Le Guennec, *Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line.* Biochim Biophys Acta, 2003. **1616**(2): p. 107-11.
36. Roger, S., et al., *Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines.* Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(4): p. 774-86.
37. Xia, J., et al., *Voltage-gated sodium channel Nav 1.7 promotes gastric cancer progression through MACC1-mediated upregulation of NHE1.* Int J Cancer, 2016. **139**(11): p. 2553-69.
38. Brisson, L., et al., *NaV1.5 Na(+) channels allosterically regulate the NHE-1 exchanger and promote the activity of breast cancer cell invadopodia.* J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 21): p. 4835-42.
39. Brisson, L., et al., *Na(V)1.5 enhances breast cancer cell invasiveness by increasing NHE1-dependent H(+) efflux in caveolae.* Oncogene, 2011. **30**(17): p. 2070-6.
40. Gillet, L., et al., *Voltage-gated Sodium Channel Activity Promotes Cysteine Cathepsin-dependent Invasiveness and Colony Growth of Human Cancer Cells.* J Biol Chem, 2009. **284**(13): p. 8680-91.

41. Yang, M., et al., *Therapeutic potential for phenytoin: targeting Na(v)1.5 sodium channels to reduce migration and invasion in metastatic breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **134**(2): p. 603-15.
42. Bon, E., et al., *SCN4B acts as a metastasis-suppressor gene preventing hyperactivation of cell migration in breast cancer*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 13648.
43. Carrithers, M.D., et al., *Regulation of podosome formation in macrophages by a splice variant of the sodium channel SCN8A*. J Biol Chem, 2009. **284**(12): p. 8114-26.
44. Diaz, D., et al., *Functional expression of voltage-gated sodium channels in primary cultures of human cervical cancer*. J Cell Physiol, 2007. **210**(2): p. 469-78.
45. Hernandez-Plata, E., et al., *Overexpression of NaV 1.6 channels is associated with the invasion capacity of human cervical cancer*. Int J Cancer, 2012. **130**(9): p. 2013-23.
46. Livak, K.J. & T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
47. Soncin, S., et al., *A practical approach for the validation of sterility, endotoxin and potency testing of bone marrow mononucleated cells used in cardiac regeneration in compliance with good manufacturing practice*. J Transl Med, 2009. **7**: p. 78.
48. Febles, N.K., S. Chandrasekaran, & Y. Fang, *Resonant Waveguide Grating Imager for Single Cell Monitoring of the Invasion of 3D Spheroid Cancer Cells Through Matrigel*. Methods Mol Biol, 2017. **1571**: p. 143-160.
49. Cvetkovic, C., et al., *Investigating the Life Expectancy and Proteolytic Degradation of Engineered Skeletal Muscle Biological Machines*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 3775.
50. Linden, A., *Measuring diagnostic and predictive accuracy in disease management: an introduction to receiver operating characteristic (ROC) analysis*. J Eval Clin Pract, 2006. **12**(2): p. 132-9.
51. Caldwell, J.H., et al., *Sodium channel Na(v)1.6 is localized at nodes of ranvier, dendrites, and synapses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5616-20.
52. Levin, S.I., et al., *Impaired motor function in mice with cell-specific knockout of sodium channel Scn8a (NaV1.6) in cerebellar purkinje neurons and granule cells*. J Neurophysiol, 2006. **96**(2): p. 785-93.
53. Trudeau, M.M., et al., *Heterozygosity for a protein truncation mutation of sodium channel SCN8A in a patient with cerebellar atrophy, ataxia, and mental retardation*. J Med Genet, 2006. **43**(6): p. 527-30.
54. Black, J.A., S. Liu, & S.G. Waxman, *Sodium channel activity modulates multiple functions in microglia*. Glia, 2009. **57**(10): p. 1072-81.
55. Craner, M.J., et al., *Sodium channels contribute to microglia/macrophage activation and function in EAE and MS*. Glia, 2005. **49**(2): p. 220-9.
56. Li, G.R., et al., *Characterization of multiple ion channels in cultured human cardiac fibroblasts*. PLoS One, 2009. **4**(10): p. e7307.
57. Traub, O., et al., *Shear stress-mediated extracellular signal-regulated kinase activation is regulated by sodium in endothelial cells. Potential role for a voltage-dependent sodium channel*. J Biol Chem, 1999. **274**(29): p. 20144-50.

58. Zhao, P., et al., *Voltage-gated sodium channel expression in rat and human epidermal keratinocytes: evidence for a role in pain*. Pain, 2008. **139**(1): p. 90-105.
59. Diss, J.K., et al., *A potential novel marker for human prostate cancer: voltage-gated sodium channel expression in vivo*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2005. **8**(3): p. 266-73.
60. Pecorelli, S., L. Zigliani, & F. Odicino, *Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix*. Int J Gynaecol Obstet, 2009. **105**(2): p. 107-8.
61. Vogel, C. & E.M. Marcotte, *Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(4): p. 227-32.
62. Plummer, N.W., M.W. McBurney, & M.H. Meisler, *Alternative splicing of the sodium channel SCN8A predicts a truncated two-domain protein in fetal brain and non-neuronal cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(38): p. 24008-15.
63. Burbidge, S.A., et al., *Molecular cloning, distribution and functional analysis of the NA(V)1.6. Voltage-gated sodium channel from human brain*. Brain Res Mol Brain Res, 2002. **103**(1-2): p. 80-90.
64. Arreola, J., S. Spires, & T. Begenisich, *Na⁺ channels in cardiac and neuronal cells derived from a mouse embryonal carcinoma cell line*. J Physiol, 1993. **472**: p. 289-303.
65. Kubo, Y., *Development of ion channels and neurofilaments during neuronal differentiation of mouse embryonal carcinoma cell lines*. J Physiol, 1989. **409**: p. 497-523.
66. Rush, A.M., S.D. Dib-Hajj, & S.G. Waxman, *Electrophysiological properties of two axonal sodium channels, Nav1.2 and Nav1.6, expressed in mouse spinal sensory neurones*. J Physiol, 2005. **564**(Pt 3): p. 803-15.
67. Sanchez-Sandoval, A.L., *Participacion de los canales de sodio activados por voltaje en las propiedades metastásicas de líneas celulares de cáncer cervicouterino: regulación por estradiol, EGF y subunidades beta*. 2013, Universidad Nacional Autónoma de México.
68. Busco, G., et al., *NHE1 promotes invadopodial ECM proteolysis through acidification of the peri-invadopodial space*. FASEB J, 2010. **24**(10): p. 3903-15.
69. Cardone, R.A., V. Casavola, & S.J. Reshkin, *The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(10): p. 786-95.
70. Bourguignon, L.Y., et al., *CD44 interaction with Na⁺-H⁺ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion*. J Biol Chem, 2004. **279**(26): p. 26991-7007.
71. Taves, J., et al., *Sodium hydrogen exchanger and phospholipase D are required for alpha1-adrenergic receptor stimulation of metalloproteinase-9 and cellular invasion in CCL39 fibroblasts*. Arch Biochem Biophys, 2008. **477**(1): p. 60-6.
72. Tong, X.P., et al., *Ca(2+)-signaling evoked by activation of Na(+) channels and Na(+)/Ca(2+) exchangers is required for GABA-induced NG2 cell migration*. J Cell Biol, 2009. **186**(1): p. 113-28.
73. Brackenbury, W.J., *Voltage-gated sodium channels and metastatic disease*. Channels (Austin), 2012. **6**(5): p. 352-61.
74. Crosbie, E.J., et al., *Human papillomavirus and cervical cancer*. Lancet, 2013. **382**(9895): p. 889-99.

75. Cestele, S., et al., *Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by beta-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II*. Neuron, 1998. **21**(4): p. 919-31.
76. de la Vega, R.C. & L.D. Possani, *Novel paradigms on scorpion toxins that affects the activating mechanism of sodium channels*. Toxicon, 2007. **49**(2): p. 171-80.
77. Ding, Y. & M.B. Djamgoz, *Serum concentration modifies amplitude and kinetics of voltage-gated Na⁺ current in the Mat-LyLu cell line of rat prostate cancer*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(7): p. 1249-60.
78. Anderson, J.D., et al., *Voltage-gated sodium channel blockers as cytostatic inhibitors of the androgen-independent prostate cancer cell line PC-3*. Mol Cancer Ther, 2003. **2**(11): p. 1149-54.
79. Xing, D., et al., *Expression of neonatal Nav1.5 in human brain astrocytoma and its effect on proliferation, invasion and apoptosis of astrocytoma cells*. Oncol Rep, 2014. **31**(6): p. 2692-700.
80. Mohammed, F.H., et al., *Blockade of voltage-gated sodium channels inhibits invasion of endocrine-resistant breast cancer cells*. Int J Oncol, 2016. **48**(1): p. 73-83.
81. Zucker, S., J. Cao, & W.T. Chen, *Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment*. Oncogene, 2000. **19**(56): p. 6642-50.
82. Shuman Moss, L.A., S. Jensen-Taubman, & W.G. Stetler-Stevenson, *Matrix metalloproteinases: changing roles in tumor progression and metastasis*. Am J Pathol, 2012. **181**(6): p. 1895-9.
83. Ariyoshi, W., et al., *Mechanisms involved in enhancement of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages by interleukin-33*. J Cell Physiol, 2017. **232**(12): p. 3481-3495.
84. Vinnakota, K., et al., *M2-like macrophages induce colon cancer cell invasion via matrix metalloproteinases*. J Cell Physiol, 2017. **232**(12): p. 3468-3480.
85. Zucker, S. & J. Vacirca, *Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2004. **23**(1-2): p. 101-17.
86. Murphy, D.A. & S.A. Courtneidge, *The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(7): p. 413-26.
87. Cong, D., et al., *Upregulation of NHE1 protein expression enables glioblastoma cells to escape TMZ-mediated toxicity via increased H(+) extrusion, cell migration and survival*. Carcinogenesis, 2014. **35**(9): p. 2014-24.
88. Yang, X., et al., *Expression and modulation of Na(+) /H(+) exchanger 1 gene in hepatocellular carcinoma: A potential therapeutic target*. J Gastroenterol Hepatol, 2011. **26**(2): p. 364-70.
89. Hossain, M.M., P.K. Sonsalla, & J.R. Richardson, *Coordinated role of voltage-gated sodium channels and the Na⁺/H⁺ exchanger in sustaining microglial activation during inflammation*. Toxicol Appl Pharmacol, 2013. **273**(2): p. 355-64.

APÉNDICE

Artículos publicados durante los estudios de doctorado

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

The invasiveness of human cervical cancer associated to the function of $\text{Na}_v1.6$ channels is mediated by MMP-2 activity

Received: 6 April 2018

Accepted: 16 August 2018

Published online: 29 August 2018

Osbaldo Lopez-Chacás¹, Ana María Espinosa², Ana Alfaro², Zazil Herrera-Carrillo¹, Belen Ernestina Ramirez-Cordero¹, Pedro Cortes-Reynosa³, Eduardo Perez Salazar³, Jaime Berumen² & Juan Carlos Gomora¹

Voltage-gated sodium (Na_v) channels have been related with cell migration and invasiveness in human cancers. We previously reported the contribution of $\text{Na}_v1.6$ channels activity with the invasion capacity of cervical cancer (CeCa) positive to Human Papilloma Virus type 16 (HPV16), which accounts for 50% of all CeCa cases. Here, we show that $\text{Na}_v1.6$ gene (*SCN8A*) overexpression is a general characteristic of CeCa, regardless of the HPV type. In contrast, no differences were observed in $\text{Na}_v1.6$ channel expression between samples of non-cancerous and cervical intraepithelial neoplasia. Additionally, we found that CeCa cell lines, C33A, SiHa, CaSk and HeLa, express mainly the splice variant of *SCN8A* that lacks exon 18, shown to encode for an intracellularly localized $\text{Na}_v1.6$ channel, whereas the full-length adult form was present in CeCa biopsies. Correlatively, patch-clamp experiments showed no evidence of whole-cell sodium currents (I_{Na}) in CeCa cell lines. Heterologous expression of full-length $\text{Na}_v1.6$ isoform in C33A cells produced I_{Na} , which were sufficient to significantly increase invasion capacity and matrix metalloproteinase type 2 (MMP-2) activity. These data suggest that upregulation of $\text{Na}_v1.6$ channel expression occurs when cervical epithelium have been transformed into cancer cells, and that $\text{Na}_v1.6$ -mediated invasiveness of CeCa cells involves MMP-2 activity. Thus, our findings support the notion about using Na_v channels as therapeutic targets against cancer metastasis.

Cervical cancer (CeCa) is the second most frequent female cancer worldwide with more than half a million new cases every year; and about 250,000 deaths annually, which locates CeCa as the third leading cause of cancer-related deaths in females in developing countries. The human papillomavirus (HPV) is present in virtually all CeCa patients and it is considered the main risk factor for developing this carcinoma. Fifteen HPV genotypes have been classified as 'high-risk' due to their oncogenic potential and they are associated with most CeCa patients¹. HPV type 16 (HPV16) is the most frequent accounting for more than 50% of CeCa cases, followed by HPV18 (17%) and others (25%); altogether high-risk HPV types are responsible for more than 95% of all CeCa cases¹. Around fifteen percent of CeCa patients are diagnosed as metastatic cervical cancer (MCC) which has a poor survival prognosis^{2,3}. Particularly, matrix metalloproteinases (MMPs) have been associated with cervical cancer progression as in other human cancers^{4–6}. Commercial vaccines against HPV16 and HPV18 have been very effective to prevent infection of cervical epithelium, also in preventing the development of high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with these HPV types. However, these vaccines are limited to offer protection only for a few of the fifteen high-risk HPV types and it is still unknown whether the immune response will remain unchanged until the age of peak incidence for CeCa. In addition, predictions of global incidence and mortality for CeCa display an increase if vaccinated women are not included in early screening programs for CeCa². Therefore, to develop new strategies for CeCa early detection and new therapeutic approaches for metastatic cervical cancer remains as an urgent goal.

¹Departamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 04510, Mexico. ²Unidad de Medicina Genómica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México/Hospital General de México, Ciudad de México, 06720, Mexico. ³Departamento de Biología Celular, Cinvestav-IPN, Av. IPN # 2508, San Pedro Zacatenco, Ciudad de México, 07360, Mexico. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.C.G. (email: jgomora@ifc.unam.mx)

Voltage-gated sodium (Na_v) channels are protein complexes formed by a large pore-forming α -subunit and smaller auxiliary β -subunit. Since their first description, Na_v s have been canonically related to the generation and propagation of action potentials in excitable cells⁷. However, more recently several studies have shown that Na_v s are functionally expressed in several epithelial cancers (breast, cervix, colon, gastric, lung, prostate, ovary), as well as in other cancer types (glioma and leukemia), while they are not or are poorly expressed in the cognate non-cancerous tissue^{8,9}. The abnormal expression of Na_v s in human malign cells has been mainly associated with the invasiveness and cancer progression^{10–17}.

Mechanistic issues about participation of Na_v s on invasive properties of cancer cells has been widely studied in human breast cancer^{18–21} and more recently in gastric cancer¹⁰. The pore-forming $\text{Na}_v1.5$ subunit is expressed in highly aggressive human breast cancer cells but it has not been associated with the triggering of action potentials. Instead, it enhances extracellular matrix (ECM) degradation by increasing the activity of the Na^+/H^+ exchanger 1 (NHE-1)^{18,19}, promoting a consecutive activation of extracellular acidic cysteine cathepsins, and by modifying F-actin polymerization via Src kinase activity to acquire a cellular invasive morphology which altogether promote invadopodial activity and cell invasiveness^{18–20}. Additionally, the loss of *SCN4B* in human breast cancer cells, gene that encodes for the $\text{Na}_v\beta 4$ subunit of VGSCs, promotes the acquisition of an amoeboid-mesenchymal hybrid phenotype associated with metastases, while its overexpression reduces cancer cell invasiveness²², demonstrating new non-canonical functions for the auxiliary $\text{Na}_v\beta$ subunits in addition to those shown for the pore-forming α -subunits of Na_v s. In addition, a recent study showed that $\text{Na}_v1.7$ channels encoded by the *SCN9A* gene is abundantly expressed in human gastric cancer where its activity induced an increase in NHE-1 expression, proliferation, invasion, and expression of the oncogene *metastasis-associated in colon cancer-1* (MACC1)¹⁰.

Another sodium channel, the $\text{Na}_v1.6$ isoform (encoded by the *SCN8A* gene) has been found to be expressed exclusively in macrophages derived from human monocytic leukemia and cancer cells from human melanoma but exclusively in intracellular vesicles. The activity of this sodium channel contributes to the cellular invasion through its effects on podosome and invadopodia formation via a mechanism involving intracellular movement of sodium and calcium ions as well as F-actin cytoskeletal remodeling in these cells²³.

We have previously reported the functional expression of Na_v s in cervical cancer (CeCa) biopsies and primary cultures positives to HPV16. Among all Na_v s, the $\text{Na}_v1.6$ isoform is specifically overexpressed and has a direct contribution to the invasion capacity of these cancer cells. In addition, $\text{Na}_v1.6$ protein showed a distinct subcellular distribution in cancer versus non-cancer cells, suggesting a cancer-associated relocation of these sodium channels to the plasma membrane^{24,25}. However, whether these findings about the relevance of $\text{Na}_v1.6$ channels in CeCa positive to HPV16 are conserved in the other 50% of total cases of CeCa, remains as a pending issue. Also, the mechanism involved in the $\text{Na}_v1.6$ -mediated cervical cancer cell invasiveness has not been addressed previously. In this study, we investigated the expression of *SCN8A* gene in biopsies representing almost all subtypes of human CeCa. We also explored the expression of *SCN8A* and $\text{Na}_v1.6$ protein in the neoplasia-carcinoma sequence of human cervical tissue, using samples from non-cancerous cervix, low- and high-grade cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer. In addition, by using a heterologous expression system we obtain the first insights into the mechanism underlying the cell invasion driven by $\text{Na}_v1.6$ channels in CeCa, which involves the specific secretion and activity of MMP-2. The findings of this work improve our understanding of CeCa invasion mechanisms and provide the experimental support for the consideration of $\text{Na}_v1.6$ channels as molecular targets for cervical cancer therapy.

Results

The overexpression of *SCN8A* is a distinctive characteristic of invasive cervical cancer. The $\text{Na}_v1.6$ channels are highly expressed in both central and peripheral nervous system particularly at nodes of Ranvier, synapses and dendrites where they play an important role in generating action potentials for the high speed propagation of electrical signals²⁶. Consequently, the loss of $\text{Na}_v1.6$ function cause severe motor and cognitive disorders^{27,28}. On the other hand, there are several evidences that show the expression of $\text{Na}_v1.6$ channels in normal non-excitable and cancer cells in which they actively participate in physiological^{29–33} and pathophysiological^{11,12,23,34} processes, respectively. We have previously demonstrated that the *SCN8A* gene, which encodes the $\text{Na}_v1.6$ sodium channel, was forty-times more abundant in CeCa positive to HPV16 than in non-cancerous cervix²⁵. Therefore, we investigated whether this abnormal expression of *SCN8A* gene was a shared feature for CeCa biopsies positive to other major oncogenic HPV types. Total RNA was isolated from human non-cancerous cervix (NCC; $n = 19$); low-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN1; $n = 23$), high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2/3; $n = 16$) and invasive cervical cancer positive to the main oncogenic HPV types: 16, 18, 31, 45, 51, 52, 58, 59 and 68 (CeCa; $n = 57$) for the experiments of quantitative PCR. Expression of 18S gene was assessed in all samples and this was used as a reference gene for the quantitative analysis (Supplementary Fig. S1). The expression analysis indicated an upregulation of *SCN8A* gene in the invasive CeCa samples regardless of the oncogenic HPV type, however such change was not observed in low- and high-grade cervical intraepithelial neoplasia (Fig. 1A,B and Supplementary Fig. S2), supporting the idea that *SCN8A* overexpression is associated with oncogenic transformation. In addition, there was no association between expression levels of *SCN8A* and cervical cancer staging, nor with the cellular origin of CeCa; i.e., glandular or squamous cells (Supplementary Figs S2 and S3). In order to test the potential use of the abnormal expression of *SCN8A* gene as a molecular marker for invasive cervical cancer we performed a Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis using the qPCR data from non-cancerous and CeCa samples. ROC analysis indicated that is possible to discriminate between non-cancerous samples from those of invasive cervical cancer with a higher sensitivity (~98%; Supplementary Fig. S4), than the 55% reported for the pap smear test³⁵, meaning that *SCN8A* gene levels could be more effective in identifying true positive cases that the typical pap smear test.

Because correlation between expression levels of mRNA and protein in biological systems are notoriously poor³⁶, we decided to explore semi-quantitatively the expression level of $\text{Na}_v1.6$ protein in human cervical tissue.

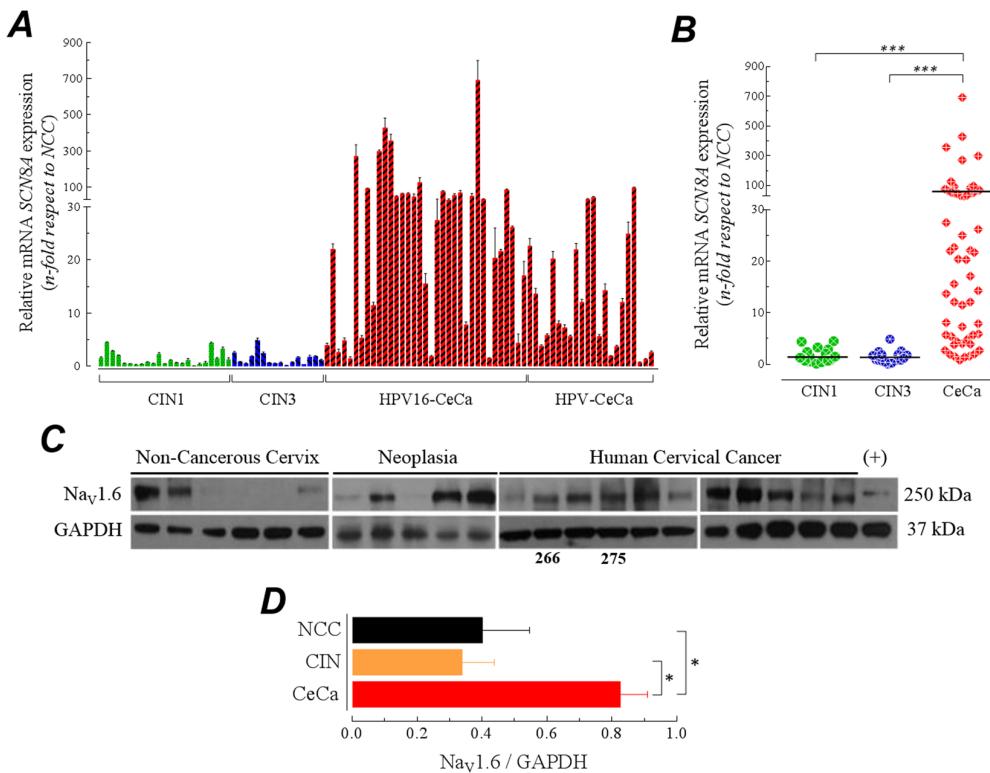


Figure 1. Exploration of SCN8A expression in the neoplasia-carcinoma sequence of human cervical tissue. (A) Expression levels of SCN8A gene in low-grade (CIN1, $n = 23$) and high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2/3, $n = 16$), as well as in invasive cervical cancer positive to HPV16 (HPV16-CeCa, $n = 35$) and invasive cervical cancer positive to other oncogenic HPV types (HPV-CeCa, $n = 22$), versus non-cancerous cervix (NCC, $n = 20$). Bars show the average fold-change ratio ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) of SCN8A gene for individual samples of each group. (B) Scattering plot of fold-change values for each group of samples. Horizontal black lines represent the fold-change mean values. SCN8A gene was significantly upregulated in cervical cancer tissues (Mann-Whitney U test, $P < 0.0001$). (C) Western blot analysis of Na_V1.6 channel expression in total protein extracts from NCC, CIN and CeCa samples. Total protein extracts from HEK293 cells stably expressing Na_V1.6 channels were used as positive control. Representative results of four independent experiments. Numbers below blots correspond to sample number. Samples 266 and 275 are those that were present in all western blots experiments shown in the present work. (D) Relative expression of Na_V1.6 protein in cervical tissue samples. Blots were quantified by densitometry and normalized to that of GAPDH for NCC ($n = 12$), CIN ($n = 10$) and CeCa ($n = 29$). Asterisks indicates $P < 0.05$ with a Student's t-test.

Total protein extracts from non-cancerous cervix, cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer samples were used for the immunoblotting experiments. We found the Na_V1.6 protein in the three groups, but it was almost twice more abundant in the cervical cancer group compared to non-cancerous or neoplasia groups. Furthermore, the protein of Na_V1.6 channels was found in one hundred percent of the cervical cancer samples while only fifty- and eighty-percent of the non-cancerous cervix and neoplasia samples, respectively, showed the signal for the Na_V1.6 protein (Fig. 1C,D). These western-blotting results were also confirmed by conventional immunohistochemical analysis of Na_V1.6 channels in human cervix tissue. Several homemade microarray of tissue containing biopsies from non-cancerous, low- and high-grade neoplasia and cancer (Fig. 2A) from human cervix were used to determine the Na_V1.6 protein immunoreactivity. Most of cervical tissue samples shown immunoreaction for Na_V1.6 protein, which clearly increases as a function of tissue transformation. Levels of Na_V1.6 protein expression were similar in low-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN1) and non-cancerous cervix (NCC) (Fig. 2A, top two rows), but they were substantially lower compared to high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN3) and CeCa (Fig. 2A, bottom two rows), suggesting that the up-regulation of Na_V1.6 protein occurs when the human cervical cells have been transformed and the tissue shows histological invasive characteristics. Importantly, Na_V1.6 protein appear to be completely distributed along the cervical cancer cells contrasting with a well located plasma membrane distribution in non-cancerous cervical cells (Fig. 2A, top row, $\times 10$ and $\times 40$ images), as previously reported for our group²⁵. On the contrary, no staining was observed in the consecutive tissue slides incubated with an irrelevant primary antibody (Fig. 2, far right column). These results show that the over-expression of the Na_V1.6 protein is a common characteristic in the invasive CeCa, but not for earlier stages of this carcinoma. In addition, immunochemistry results suggest a change in the subcellular localization of the channel protein as observed previously in CeCa biopsies positive to HPV-16²⁵.

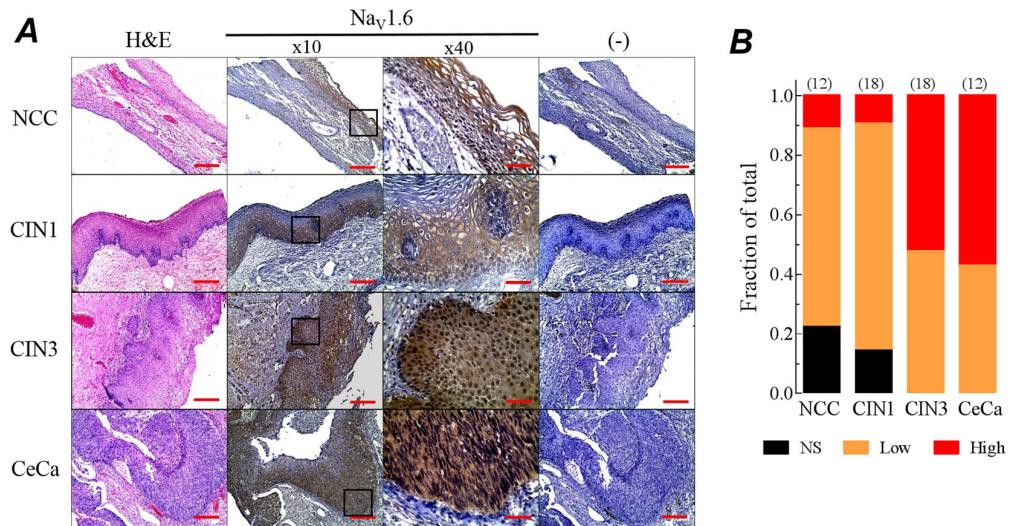


Figure 2. Immunohistochemical analysis of Na_V1.6 channels in human cervical tissue. (A) Representative images of non-cancerous cervix (NCC), low-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN1), high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN3) and invasive cervical cancer (CeCa), showing H&E staining (left column); immunohistochemical detection of Na_V1.6 channel at $\times 10$ and $\times 40$ amplifications (middle columns); and negative controls (right column), where a non-specific IgG primary antibody was used in parallel slides. Scale bars represent 100 μm , and 300 μm for $\times 40$ amplifications, respectively. (B) Fraction of total staining for each sample analyzed. Immunoreactivity intensity was evaluated as no signal (NS, black), Low (orange) and high (red) Na_V1.6 staining in NCC, CIN1, CIN3 and CeCa tissue samples. The number of analyzed slides is indicated in parenthesis at the top of each column.

Most human cervical cancer cell lines do not show sodium currents in whole-cell patch-clamp recordings. In order to gain insights into the mechanism involved in the Na_V1.6-mediated invasiveness of CeCa²⁵, we turn to the use of commercially available human CeCa cell lines. In contrast with the functional expression of Na_V channels in cancer cells derived from human cervical tumors^{24,25}, by using the whole-cell patch-clamp technique, we did not find voltage-gated sodium currents in the widely used HeLa (positive to HPV18) or SiHa (positive to HPV16) cells ($n > 50$ cells). We also explored three additional CeCa cell lines, CaSki (positive to HPV16), DotC2 (negative to HPV) and ME-180 cells (positive to HPV68), and under our experimental conditions, none of them show any evidence of voltage-gated sodium currents. An exception was the C33A cell line (negative to HPV), where a small percentage of cells (around 11%) express tiny, but clearly distinguishable, sodium currents (Supplementary Fig. S5). It is worth noting that blocking of this current with 1 μM TTX did not modify the basal invasiveness of C33A cells, nor that of SiHa and HeLa cells (Supplementary Fig. S6). Regardless of the huge discrepancy between the primary cancer cells isolated from biopsies and the commercial CeCa cell lines, several possibilities could explain the lack of sodium currents in those latter cells; here we will take into consideration the following three: (1) the mRNA is not being translated into channel protein; (2) it is translated but not translocate to the plasmatic membrane but to another intracellular compartment; and (3) the channel is at the plasma membrane but is not functional. Therefore, we performed Real Time PCR (qPCR), immunofluorescence confocal microscopy, immunoblotting and conventional PCR to explore the expression of Na_V1.6 channels in human cervical cancer cell lines. First, qPCR experiments clearly showed that CeCa cell lines express similar levels of Na_V1.6 channel messenger (SCN8A gene) to those found in some CeCa tumor biopsies (Supplementary Fig. 1). In addition, the results also indicated different levels of messenger expression among these cells, as C33A and SiHa cells contain 32-fold more copies of the Na_V1.6 messenger than HeLa cells. Then we look for evidences of the Na_V1.6 channel protein in these CeCa cell lines. Results of confocal microscopy show a less intense and more diffuse Na_V1.6-positive signal in cervical cancer cells compared with positive control (Fig. 3A, right column). In all cell lines, the Na_V1.6 channel signal was stronger in plasma membrane vicinity; interestingly, a cytosolic signal was observed mostly for CeCa cell lines (Fig. 3A, Merge column). This was better observed in three-dimensional reconstruction of images acquired in the z-plane, which suggest an intracellular distribution of Na_V1.6 protein in cervical cancer cell lines, but not for the positive control which showed an intense signal close to the plasma membrane (Fig. 3A, Merge column). Our second approach, to obtain evidences about cellular distribution of Na_V1.6 protein in cervical cancer cell lines, was carrying out western blot experiments on total, cytoplasmic and nuclear fractions of cell lysates. The results showed a full-length Na_V1.6 protein (~250 kDa) in total lysate and cytoplasmic fraction of C33A cells, but the corresponding band was absent in all fractions of HeLa cells (Fig. 3B). Interestingly, a band of ~150 kDa was detected in the enriched nuclear fraction of C33A and HeLa cells (Fig. 3B, red head arrows). The enrichment of nuclear and cytoplasmic cellular fractions was evidenced by identification of Histone-3 and GAPDH proteins, respectively. These results agree with the observation of tiny sodium currents in C33A cells, displaying full length of Na_V1.6 channel; and with the lack of those in HeLa cells, which only exhibit the smaller band of around 150 kDa. This band could be accounting for a truncated isoform of Na_V1.6³⁷.

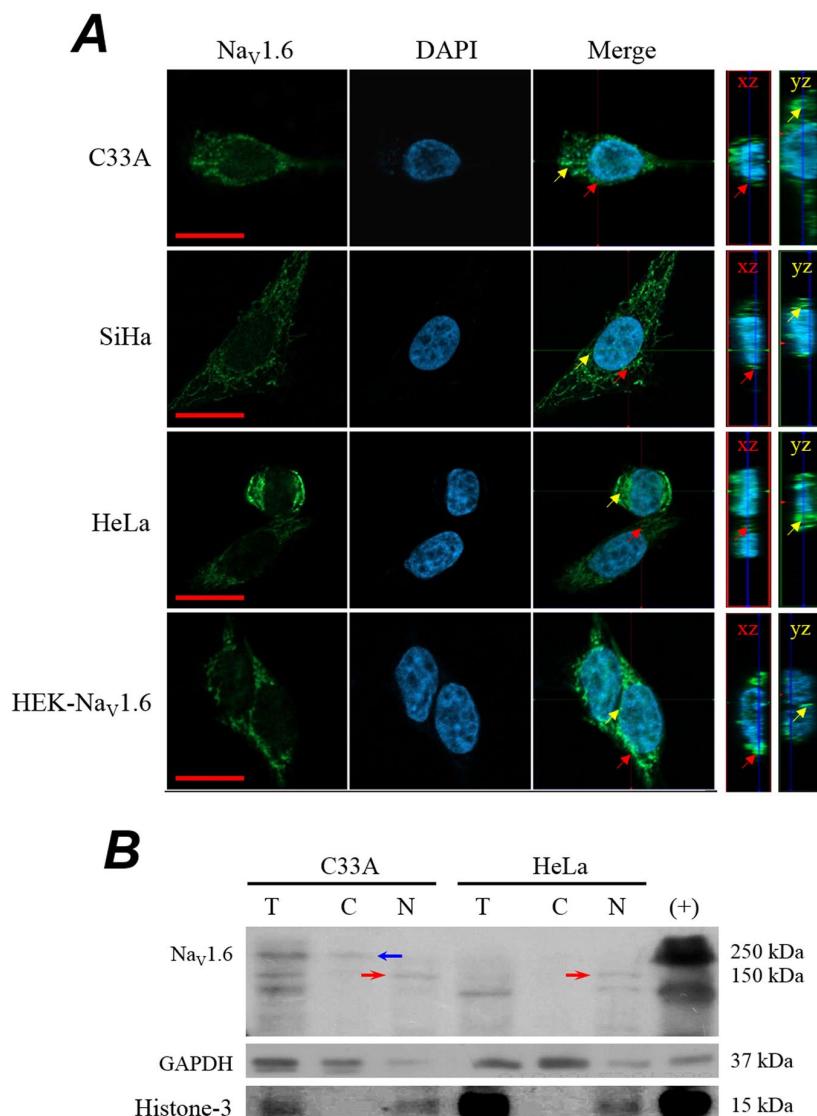


Figure 3. Expression of Na_v1.6 channels in human cervical cancer cell lines. (A) Immunofluorescence confocal microscopy analysis of Na_v1.6 channels expression in C33A, SiHa, HeLa, and HEK293 cells stably expressing Na_v1.6 channels (HEK-NaV1.6; positive control). Cervical cancer cells were incubated with an antibody against Na_v1.6 protein followed by a staining with FITC-coupled secondary antibody. DAPI reagent was used for nucleus staining. Image acquisition was performed each 0.33 μ m in a total thickness of 6.5 μ m. Confocal sections were merged and 3D-reconstructions were performed from Z-planes for each region of interest. Orthogonal projections from xz and yz planes of confocal images show positive signal for Na_v1.6 protein (far right panel), indicated by red arrows in xz and yellow arrows in yz planes, respectively. Scale bar, 10 μ m. (B) Western blot analysis of Na_v1.6 channel protein in total (T), cytoplasmic (C) and nuclear (N) protein extracts from human cervical cancer cell lines. Histone-3 and GAPDH proteins were used to demonstrate the enriching of subcellular fractions. Representative blot of three independent experiments. Notice that a ~150 kDa anti-Na_v1.6 reactive protein (red arrows) was found in nuclear fraction from cancer cells. The full-length ~250 kDa Na_v1.6 protein was only observed in total and cytoplasmic protein extract from C33A cells.

Differential expression of SCN8A splice variants between biopsies and cell lines of cervical cancer. The processing of Na_v1.6 gene (SCN8A) generates three different variants due to the alternative splicing of Exon 18 (Fig. 4A), which in turn encodes transmembrane segments S3 and S4 in Domain III of Na_v1.6 channel³⁷. The full length is the adult variant (18A), which is functionally express in plasma membrane of most neurons³⁸; the neonatal transcript (18N) predicts a truncated two-domain protein of about 1282 amino acids (~145 kDa), which do not express sodium currents^{39,40}. The third variant is designated Δ18, this transcript maintains an open reading frame but lacks sequence encoding the S3 and S4 segments of Domain III. The expression of this variant seems to be limited to intracellular vesicular compartments regulating cellular invasion of macrophages and melanoma cells²³.

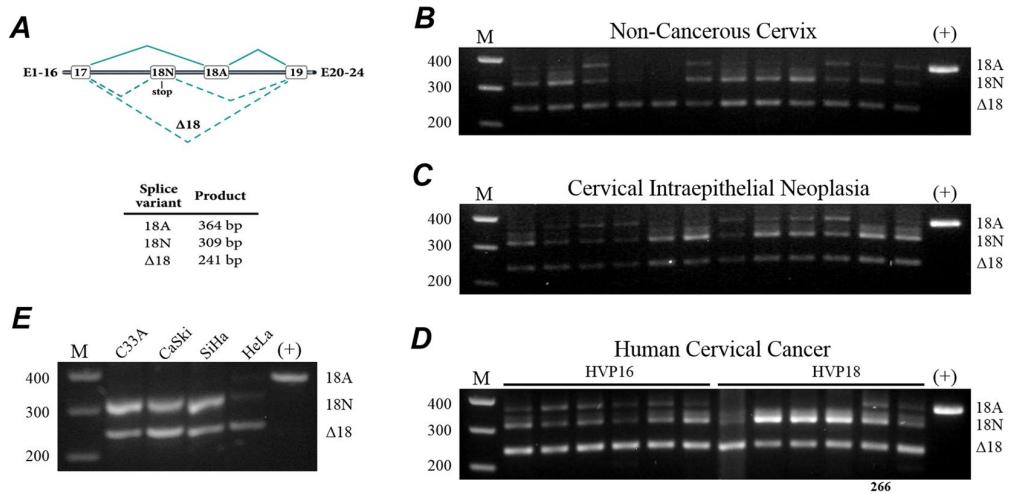


Figure 4. Alternative splicing of SCN8A exon 18 in the neoplasia-carcinoma sequence of human cervical tissue. (A) Alternative splicing of SCN8A Exon 18. Expanded genomic structure of exons 17 to 19. Exon 18N contains an in frame stop codon. Splice variants generated by alternative splicing of Exon 18 are indicated with the PCR product length expected by using primers located in Exons 17 and 19 (see Methods). (B–E) End-point PCR electrophoresis results for SCN8A exon 18 variants expressed in non-cancerous cervix, cervical intraepithelial neoplasia, invasive cervical cancer, and cervical cancer cell lines, respectively. HEK-Nav1.6 cells was used as positive control for the adult splice form of SCN8A (18A; far-right line). A 100-bp molecular weight marker was used as reference (far-left line). The SCN8A variants generated for alternative splicing of exon 18: 18A, 18N and Δ18, were identified in the indicated group of samples. Identity of the SCN8A splice forms was confirmed by automated sequencing. The SCN8A splice forms were relatively more abundant in human cervical cancer samples, more clearly for the Δ18 variant; whereas the adult (18A) variant was practically absent in CeCa cell lines. From the two samples (266 and 275) that were present in all western blots experiments, only mRNA from sample 266 was available for performing these PCR analysis.

Therefore, the band of ~150 kDa detected in HeLa cells would correspond to the 18N variant of $\text{Na}_v1.6$ channel, and could explain the absence of sodium currents in the plasma membrane of CeCa cells. In order to further explore this possibility, the presence of these exon 18 variants was assessed by standard PCR protocols in non-cancerous, neoplasia and cancer biopsies from human cervical tissue as well as in cervical cancer cell lines. Primers flanking exon 18 of the SCN8A gene were used to amplify the 18A, 18N and Δ18 products with predicted sizes of 367, 314 and 244 pair bases (pb), respectively. Again, HEK293 cells stably expressing the adult form (18A) of the human SCN8A gene were used as positive control for these experiments. The results show that both 18N and Δ18 splice products of SCN8A were consistently amplified from all groups of samples studied here, although these products were clearly more abundant in samples of cervical cancer regardless of the oncogenic HPV type (Fig. 4B–D). On the other hand, the adult variant (18A) was found in 58% of non-cancerous cervical samples (Fig. 4B), 75% of neoplasia samples (Fig. 4C), and in 100% of the cervical cancer samples positive to HPV16 (Fig. 4D, left). Interestingly, only 33% of cervical cancer samples positive to HPV18 showed the 18A splice variant (Fig. 4D, right). Additionally, cervical cancer cell lines express predominantly the 18N and Δ18 splice variants; whereas the adult variant was practically absent in C33A, SiHa CaSki and HeLa cells (Fig. 4E). In summary, the lack of detectable voltage-gated sodium currents in CeCa cell lines, in particular those generated by the $\text{Na}_v1.6$ channel could be due to the preferential expression of variants 18N and Δ18 (not functional at the plasma membrane), over the adult variant (18A), the only one that generates sodium currents at the plasma membrane.

Heterologous expression of $\text{Na}_v1.6$ increases invasiveness of CeCa cell lines. Because the absence of reliable voltage-gated sodium currents in CeCa cell lines, we performed transient transfections of cervical cancer cell lines with the $\text{Na}_v1.6$ channel in order to explore its functional expression and role in the metastatic behavior of CeCa. Transfection efficiency was about 50–60% for C33A, and 30–35% for SiHa and HeLa cells (Fig. 5A). Transfected C33A cells generated very robust sodium currents in comparison with non-transfected cells (Fig. 5B). In addition, current-voltage relationship (Fig. 5C) and activation conductance (Fig. 5D) of heterologous $\text{Na}_v1.6$ channels expressed in cervical cancer cells were similar to those previously reported from our group in primary cultures derived from CeCa biopsies²⁴, and from other reports in neurons and HEK-293 cells^{38,41}, including the high sensitivity to tetrodotoxin (TTX) of these channels (Supplementary Fig. S5). In order to evaluate the potential role of these transfected $\text{Na}_v1.6$ channels in the metastatic behavior of the C33A cells, we performed *in vitro* invasion assays by using matrigel-invasion chambers. The cellular invasiveness of $\text{Na}_v1.6$ -transfected C33A cells was significantly increased (almost 5-fold) compared with control cells, this effect was prevented by the addition of 1 μM TTX to the culture media (Fig. 5E). These results support our previous observations regarding the contribution of $\text{Na}_v1.6$ channels to the invasion capacity of CeCa primary cultures²⁵, and that the heterologous expression of $\text{Na}_v1.6$ channels is enough to promote TTX-sensitive invasion of a CeCa

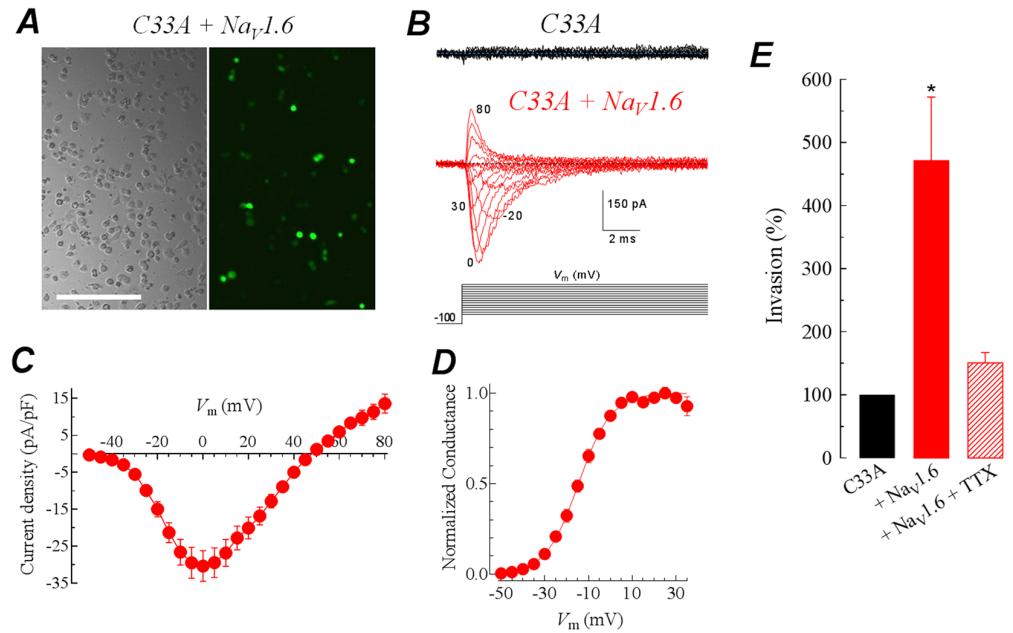


Figure 5. The heterologous expression of $\text{Na}_\text{v}1.6$ channels boost the invasive capacity of cervical cancer cell lines. (A) Representative images of phase contrast and fluorescent microscopy of C33A cells 36 h after co-transfection with $\text{Na}_\text{v}1.6$ and GFP cDNAs. GFP-fluorescence indicated that 50–60% cancer cells were positively transfected. (B) Representative families of sodium currents obtained from non-transfected (black traces) and transfected C33A cells (red traces) with the $\text{Na}_\text{v}1.6$ channel in response to 16-ms pulses that depolarized the cell membrane from -80 to $+80$ mV in 10-mV steps applied every 10 s from a holding potential of -100 mV. Dotted lines indicate the baseline (zero current). Shown recordings are the average of two current traces at any given membrane potential and filtered at 5 kHz. (C) Current-voltage relationship for $\text{Na}_\text{v}1.6$ channels heterologously expressed in C33A cells. Peak Na^+ currents were averaged and plotted as a function of the depolarizing potential (V_m). (D) Activation of normalized Na^+ conductance. Same cells as in (C). Smooth line is the fit to a Boltzmann function (see Methods) with the following parameters: $V_{1/2} = -12.2 \pm 1.2$ mV and $k = 9.7 \pm 1.0$ mV; $n = 9$ cells. (E) The heterologous expression of $\text{Na}_\text{v}1.6$ channels enhances the invasive capacity of C33A cells. Relative invasion of C33A cells transfected with $\text{Na}_\text{v}1.6$ in absence or presence of 1 μM TTX, with respect to the control, untransfected C33A cells (black column). Columns represent the mean value of three independent experiments performed in triplicate (mean \pm SD). *Statistically different from control condition ($P < 0.05$).

cell line positive to HPV16⁴². In addition, we also assessed cell proliferation by the MTT colorimetric assay and cell migration using the scratch-wound assay in the same cells transfected with the $\text{Na}_\text{v}1.6$ plasmid; as expected, the results indicated that overexpression of $\text{Na}_\text{v}1.6$ channels do not modify neither proliferation nor migration in CeCa cell lines (Supplementary Figs S7 and S8), indicating that $\text{Na}_\text{v}1.6$ channel contribution on CeCa behavior is specific for cell invasiveness.

The functional expression of $\text{Na}_\text{v}1.6$ channels increases the specific secretion and activity of matrix metalloproteinase type 2. It is well known that matrix remodeling proteinases, such as matrix metalloproteinases (MMPs), play an important role in carcinoma cell invasion⁶. Therefore, we wonder whether heterologous expression of $\text{Na}_\text{v}1.6$ channels in cervical cancer cells induces secretion of the gelatinases associated to cell invasion, *i.e.*, MMP-2 and MMP-9. First, by using gelatin zymography and western blot experiments, we determined both basal proteolytic activity and protein expression of MMP2 and MMP9 in supernatants of C33A, SiHa and HeLa cell cultures, incubated in the presence of complete medium (DMEM + 10% FBS) or fasted conditioned medium (DMEM without FBS). We found robust proteolytic activity of MMP2 and MMP9 when CeCa cells were incubated in complete medium but there was no activity when cells were fasted during 24 or 48 h. In parallel with such observations, MMP2 and MMP9 proteins were only detected in the supernatants coming from complete medium condition of CeCa cell cultures (Supplementary Fig. S9). Then, we sought to examine the effect of overexpressing $\text{Na}_\text{v}1.6$ channels in CeCa cell lines on proteolytic activity and expression of MMP2 and MMP9 when basal levels of these proteases are null, *i.e.*, incubated under fasted conditioned medium at 48 h. Thus, C33A, SiHa and HeLa cells transfected with $\text{Na}_\text{v}1.6$ channel were grown in conditioned medium for 48 h, after that, culture medium was recovered and cells were lysed. Secretion and activity of MMP-2 and MMP-9 were analyzed as a whole by gelatin zymography, whereas immunoblotting for GAPDH protein from cell lysates was used as a load control. In all three cervical cancer cells, regardless of whether or not they were positive to any type of HPV, we found degradation bands at 72 kDa, corresponding to the size of MMP-2, although with different intensities among the three CeCa cell lines (Fig. 6A). The activity of this metalloproteinase was more robust in SiHa cells (HPV-16),

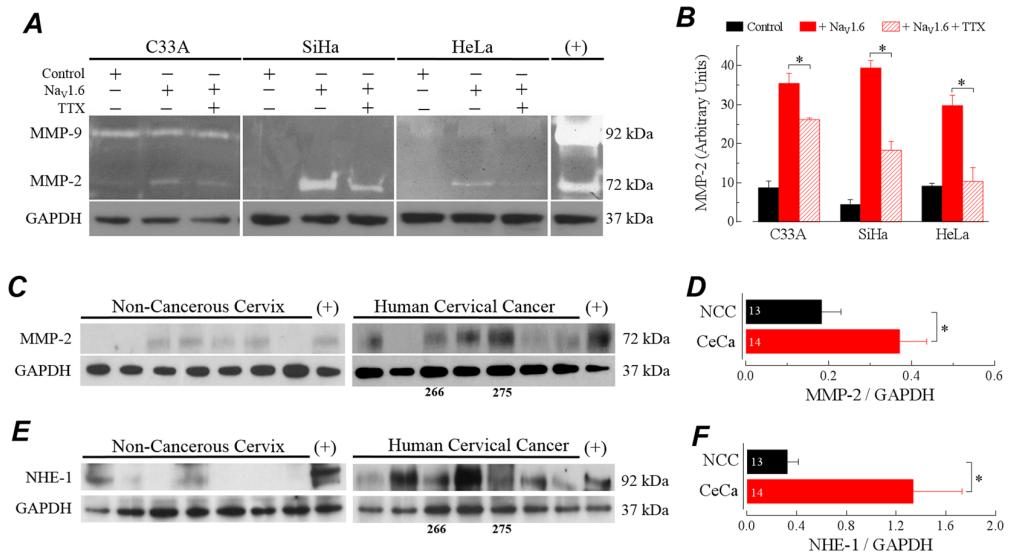


Figure 6. Na_v1.6 channels activity induces secretion of MMP-2 in cervical cancer cell lines. **(A)** Gelatin zymography for conditioned medium from cervical cancer cell lines. C33A, SiHa and HeLa cells were transfected with Na_v1.6 and grown for 24 h in absence or presence of 1 μM TTX. Conditioned medium was obtained and cells were lysed. Activity for gelatinases MMP-2 and MMP-9 was analyzed on equal volumes of concentrated conditioned medium by using gelatin-substrate polyacrylamide gel electrophoresis followed by an incubation in activity buffer and a staining with Coomassie blue. The conditioned medium obtained from MCF-7 cells treated with 100 ng/ml phorbol 12, 13-dibutyrate (PDB) for 40 h, was used as positive control. Proteolytic activity was detected as clear bands against a dark background of undigested substrate (*upper panel*). Total protein extracts from cell lysates were analyzed by western blotting with anti-GAPDH antibody (*bottom panel*). The results shown are representative of three independent experiments. **(B)** Secretion of MMP-2 was quantified by densitometry analysis using GAPDH bands for normalizing. Results are given as the amount of gelatin degradation showed as clear bands relative to GAPDH bands for each condition. Columns are means ± SD from three independent experiments. *Statistically significant as $P < 0.05$. **(C)** Representative western blot for MMP-2 expression in total protein extracts from human biopsies of NCC and CeCa. Blots were stripped and re-probed for total GAPDH as the loading control. **(D)** Expression of MMP-2 protein was studied by densitometry analysis of western blot experiments. Results are given as the amount of MMP-2 protein relative to that of GAPDH for NCC ($n = 13$) and CeCa ($n = 14$). Columns are means ± SEM. * Statistically significant as $P < 0.05$. **(E)** Western blot analysis of NHE-1 expression and **(F)** relative levels of NHE-1 protein in the same samples of panel **(C)** and **(D)**, respectively. Data are means ± SEM, * $P < 0.05$. Samples used in **(C)** and **(E)** are exactly the same.

than in HeLa (HPV-18) or in C33A (negative to HPV). Regardless of the intensity, the activity of MMP-2 was significantly increased after cells were transfected with the Na_v1.6 channel and the presence of 1 μM TTX in this last condition prevented partially this increase in MMP-activity (Fig. 6A,B). On the contrary, secretion and activity of MMP-9 was only observed in C33A cells without evident changes among treatments (Fig. 6A). These results suggest a potential role for the MMP-2 in the Na_v1.6-mediated invasion of CeCa cell lines, therefore we look for the expression of this metalloproteinase in fresh cervical tissue samples. Western blot results showed that MMP-2 protein is expressed in total protein extracts from non-cancerous cervix and cervical cancer biopsies (Fig. 6C), however the immunoreactivity of the detected bands was around 2-fold more intense in CeCa samples (Fig. 6D). It has been shown that NHE-1, a regulator of intracellular pH, is essential for tumor invasive capacity^{10,43,44}, and that its function play a role in the acidification needed for proteases activation^{44–46}. Thus, we evaluated the expression of the NHE-1 in the same samples where we observed the up-regulation of the matrix metalloproteinase type 2. Western blots show the presence of NHE-1 protein in 4 out of 13 (31%) biopsies of NCC and in 9 out of 14 (64%) of CeCa biopsies (Fig. 6E). The densitometric analysis of protein bands suggest a 3-fold up-regulation in the relative expression of NHE-1 in CeCa biopsies compared with non-cancerous cervical tissue (Fig. 6F). Similar results were obtained for the evaluation of protein expression of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger type 1(NCX-1; a likely modulator of the activity of NHE-1) in the same uterine cervix biopsies (Supplementary Fig. S10).

Because several classes of proteases, additional to MMPs, have been involved in the degradation of the extracellular matrix (ECM) associated to cancer invasion and progression^{9,47}, we assess whether the overexpression of Na_v1.6 channel in cervical cancer cell lines could regulate the activity of such proteases. To address this issue, we performed invasion assays of Na_v1.6-transfected C33A cells in the presence of different proteases inhibitors as GM6001 (broad spectrum MMP-inhibitor), cysteine cathepsins (E-64) and serine and threonine peptidases (Leupeptin). The results suggest that the invasiveness of C33A cells lead by the Na_v1.6 activity could be specifically attributed to MMP activity, as only GM6001 significantly attenuates the increase in C33A cells invasion due

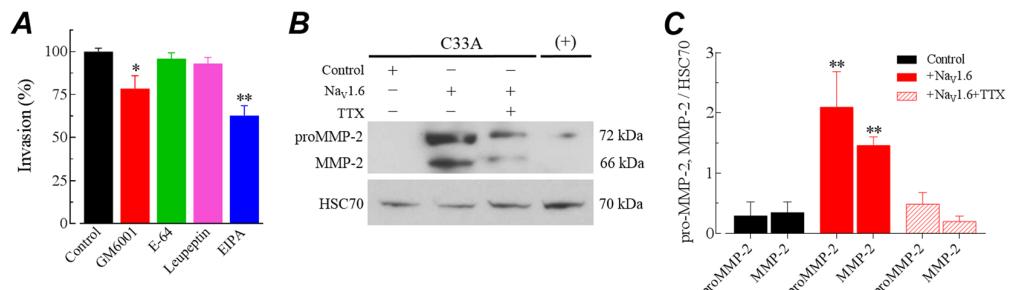


Figure 7. The promotion of CeCa cell invasiveness by Na_v1.6 channels activity is mainly through secretion of pro- and mature MMP-2 forms. (A) Effect of protease inhibitors and EIPA on invasive capacity of Na_v1.6-transfected C33A cells. Cells C33A transfected with Na_v1.6 were seeded at cellular density of 6×10^4 cells per insert in the absence (Control) or the presence of protease inhibitors (GM6001, 25 μ M; E-64, 100 μ M; Leupeptin, 100 μ M), or the NHE-1 specific inhibitor (EIPA, 1 μ M) using a serum gradient of 10% for 48 h. For these experiments, invasive cells were stained with DAPI, photographed and counted automatically. Results from six experimental observations of two independent experiments are expressed as relative invasion (mean \pm SD), normalized to the control condition. Statistical difference at $P < 0.05$ for * and $P < 0.01$ for ** (Mann-Whitney Rank Sum test). (B) Representative western blotting experiment for the analysis of pro- and mature MMP-2 forms in supernatants of C33A cultures. Conditioned medium from C33A cells transfected with Na_v1.6 and grown in the absence or the presence of 1 μ M TTX was recovered after 48 h and concentrated by centrifugation. HSC70 was used as a loading control. Supernatants form C33A cells grown in complete medium (10% FBS) served as a positive control (+). (C) Evaluation of pro- and mature MMP-2 expression. Quantification was made by densitometric analysis of western blot images. Results are given as the amount of pro-MMP2 and MMP-2 protein relative to that of HSC70 in cell lysates. Columns are mean \pm SD from three independent experiments. *Significantly different from Control at $P < 0.01$. There were no significant differences between proMMP-2 and MMP-2 forms in Na_v1.6-transfected C33A cells (solid red columns).

to the overexpression of Na_v1.6 channels in these cells (Fig. 7A). Interestingly, in accordance with this observation, a stronger attenuation in the amount of invasive cells was observed by using EIPA, an inhibitor of the NHE-1 exchanger, confirming the participation of the NHE-1 exchanger in the acidification of the extracellular matrix required for the activity of MMPs. Finally, in order to get some insights about the regulation of MMP-2 induced by the activity of Na_v1.6 channels, we measured the levels of immature (proMMP-2) and mature (MMP-2) forms of this metalloproteinase in supernatants of Na_v1.6-transfected C33A cell cultures in the absence and the presence of 1 μ M TTX. The results are summarized in Fig. 7B,C. Western blotting analysis show that the overexpression of Na_v1.6 channels in C33A cells induced robust increments in both the proMMP-2 (7-fold) and the mature form of MMP-2 (4-fold) in the supernatants, in comparison with plain C33A cells supernatants (Fig. 7C). These increments were prevented by the blocking of Na_v1.6 channels with TTX.

Discussion

During the last two decades new non-canonical, *i.e.* non-excitable, functions for voltage-gated sodium channels have emerged, mainly for the metastatic behavior of several epithelial carcinomas^{9,47}. We previously show that Na_v1.6 channel plays an important role for the invasiveness of cervical cancer primary cells. Even though several α -subunits of Na_v channels were expressed in biopsies and primary cultures of CeCa, only the messenger for Na_v1.6 was over expressed (around 40-fold) in comparison with cervical non-cancerous cells^{24,25}. The suppression of Na_v1.6 channels activity resulted in a substantial reduction of cell invasion without affecting proliferation or migration parameters²⁵. All these results were obtained by using biopsies positives to HPV-16, the most frequent viral type detected in CeCa, accounting for approximately 50% of all cases; however, at least eight more high-risk types of HPVs (18, 58, 33, 45, 31, 52 and 35) account for an additional 40% of CeCa cases^{1,48}. In the present study we have found that the over expression of Na_v1.6 channels is also conserved in CeCa biopsies positive to other high-risk HPV types, that together with our results in samples positive to HPV-16, allowed us to conclude that Na_v1.6 channel over expression is a general characteristic of cervical carcinoma, regardless the associated HPV-type. In addition, the increase in RNA messenger was also accompanied with a significant up-regulation of the Na_v1.6 channel protein in CeCa biopsies when compared with non-cancerous cervical tissue. Interestingly, the boost in the channel protein resulted in changes in the subcellular localization, as the strongest signal was observed in intracellular compartments in CeCa samples whereas in NCC tissue it was more abundant in the plasma membrane (Fig. 2). Thus, SCN8A gene is upregulated in most of human cervical cancer cases (around 90% of all) compared with both non-cancerous cervix and cervical intraepithelial neoplasia samples. Additionally, these deregulated SCN8A levels allowed to discriminate with high sensitivity and specificity cases of non-cancerous cervix from invasive cervical cancer (Supplementary Fig. S4). However, further studies are needed to determine the potential use of the expression levels of SCN8A as a predictive or prognostic molecular marker for human cervical cancer.

To further study the contribution of Na_v1.6 channels to the invasiveness of cervical cancer²⁵, we used commercially available CeCa cell lines; however, exhaustive patch-clamp whole-cell recordings in four different CeCa cell lines provided no evidence of voltage-gated sodium currents, except in C33A cells (characterized for being

negative to any HPV type), which displays very small endogenous sodium currents (Fig. 5B). Despite this fact, our immunofluorescence, western blot and PCR experiments (Figs 3 and 4) provide strong evidences about the presence of $\text{Na}_v1.6$ channels in intracellular compartments of CeCa cell lines, mainly in C33A, SiHa and HeLa cells. It has been shown previously in macrophages and melanoma cells that an isoform of $\text{Na}_v1.6$ channel is expressed intracellularly, in vesicles that are distributed throughout the cytoplasm, but not at the plasma membrane⁴⁹. The activity of these $\text{Na}_v1.6$ channels was shown to regulate cellular invasion of macrophages and melanoma cells. The channel isoform was identified as a full-length splice variant of SCN8A that lacks exon 18 ($\Delta 18$)²³. In agreement with these reports, our results show a stronger expression of the $\Delta 18$ variant in CeCa cell lines and biopsies than in NCC and CIN tissue samples (Fig. 4), suggesting a putative role of this variant in CeCa cellular invasion as shown for leukemia and melanoma cells²³. This observation could be a partial explanation for the widely distributed immunoreactivity signal of $\text{Na}_v1.6$ channel in cervical cancer cells and tissues compared with the localized plasma membrane signal in non-cancerous slice tissues (Figs 2 and 3), as the $\Delta 18$ variant of $\text{Na}_v1.6$ channels has been localized only in intracellular compartments²³. Furthermore, this could explain also the lack of plasma membrane currents in all CeCa cell lines that we explored in this work. In summary, the results from this section show for the first time the expression of SCN8A splice forms during progression of human cervical cancer. It is worth nothing that our previous results with CeCa primary cultures indicates a role for the $\text{Na}_v1.6$ channels expressed in the plasma membrane, as blocking its activity with the Cn2 scorpion toxin decreased the invasiveness behavior of the CeCa primary culture cells lines²⁵. Because Cn2 toxin is not membrane-permeable and its known mechanism of action consists in modifying $\text{Na}_v1.6$ channels gating by binding to extracellular receptor sites^{50,51}, the described effect on cell invasion must be due mainly to the interaction with the $\text{Na}_v1.6$ channels locate at the plasma membrane of such CeCa tumor cells. In the case of the putative intracellular expression of $\text{Na}_v1.6$ channels in CeCa cell lines, it remains to be confirmed if the channel is functional at the intracellular compartments and whether this has any contribution to the metastatic behavior of these cell lines. Also, these observations indicate that cell lines might not be fully representative of primary cultures derived from fresh tumor biopsies, as the latter showed plasma membrane voltage-activated sodium currents²⁵, whereas in this study we demonstrated that, under our experimental conditions, CeCa cell lines lack these type of currents. A likely explanation for this discrepancy could be the experimental conditions, for instance, it has been shown that serum concentrations higher than 5% in the cell culture has a significant decrease in Na_v s activity in rat prostate cancer cell line⁵²; the CeCa cell lines we used here have been growing in 10% FBS conditions since they were immortalized. Therefore, it is likely that Na_v channels in plasma membrane of CeCa cell lines were down-regulated for serum and/or some other extracellular growth factors used in the daily propagation of these cell lines.

In this work we also initialized the study about the mechanism underlying the regulation of CeCa cell invasion mediated by $\text{Na}_v1.6$ channels. We found that heterologously expressed $\text{Na}_v1.6$ channels increase the invasive capacity cervical cancer cells. Furthermore, the inhibition of $\text{Na}_v1.6$ channel activity by TTX, prevents the enhanced invasive capacity of CeCa cells (Fig. 5). Interestingly, the proliferation and migration properties of these cancer cells was not significantly affected (Supplementary Figs S7 and S8). These results are in agreement with previous data from our group and others suggesting that the activity of plasma membrane expressed Na_v channels is mainly associated to cell invasiveness in several types of cancer^{10–15,17,25}, although a few reports indicate that Na_v channels also control cell proliferation and migration in astrocytoma, prostate and gastric cancer^{13,53,54}. Recently, it has been shown that pro-invasive effect of $\text{Na}_v1.5$ channel in breast cancer cells is modulated in part through enhancement of MMPs activity⁵⁵. Matrix metalloproteinases (MMPs) are secreted proteases that induce degradation of various components of the basement membrane and extracellular matrix (ECM) including collagens, laminin, fibronectin, tenascin, elastin and proteoglycans³⁶. It has been demonstrated that MMPs play a crucial role in tumor invasion and migration, as well as other cancer hallmarks^{6,57}. Within the several MMPs associated to cancer invasion and progression, MMP-2 and MMP-9 have been particularly upregulated in several tumor types^{58–60}. In the present work, we found that functional expression of $\text{Na}_v1.6$ channels at the plasma membrane of cervical cancer cells enhances activity and protein expression of MMP-2 in a specific manner, as MMP-9 did not show changes in the proteolytic activity (Fig. 6). The activity of other proteases like cysteine cathepsins, and serine and threonine peptidases could be discarded also because specific inhibitors did not affected the invasion promoted by the overexpression of $\text{Na}_v1.6$ channels in C33A cells (Fig. 7A). In addition, according to our western blot analysis of immature and mature forms of MMP-2, we propose that $\text{Na}_v1.6$ activity in C33A cells promotes the secretion and the maturation (activity) of MMP-2 that leads the increase in invasiveness of this CeCa cells. In this regard, matrix metalloproteinase type 2 (MMP-2) and type 9 (MMP-9) have been found at the mature invadopodia of cancer cells where they are also secreted⁶¹, and also mediate colon cancer cell invasion⁵⁸. Recent advances have highlighted the relevance of the extracellular acidification in the tumor microenvironment for cell invasive capacity and cancer cell propagation^{10,44}. In this regard, the Na^+/H^+ exchanger-1 (NHE-1) is highly expressed in several tumors and has been implicated as necessary protein for cell invasion by regulating extracellular and intracellular pH^{10,62,63}. In addition, a previous study reported that inhibition of $\text{Na}_v1.6$ channels activity decreased the protein expression levels of NHE-1 in mouse microglial cells⁶⁴. Therefore, these bibliographic data prompted us to question whether the enhanced activity and expression of MMP-2 in CeCa cells and tissue was accompanied by a change in the NHE-1 protein expression. Our western blots results confirmed that both proteins NHE-1, and also the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX-1), were upregulated in human cervical biopsies (Fig. 6E and Supplementary Fig. S10). Furthermore, the observation that invasion of $\text{Na}_v1.6$ -transfected C33A cells was significantly reduced by inhibit the function of NHE-1 (Fig. 7A), strongly suggests that acidification of the extracellular matrix is a crucial requirement for the activity of MMPs. Thereby highlighting a possible relationship between the $\text{Na}_v1.6$ channels activity, the up regulation of the NHE-1 and the enhanced activity of MMP-2, that could lead to the observed increase in cell invasion of cervical cancer cells.

In conclusion, this study shows that SCN8A gene expression is upregulated in human cervical tissue only when cancer has been established. At this stage the alternative splicing of SCN8A gene favors the $\Delta 18$ variant

over the neonatal and the adult variants. The invasive capacity of cervical cancer cells associated to $\text{Na}_v1.6$ channels activity is mediated by a mechanism that involves the participation of NHE-1 and the specific secretion and proteolytic activity of MMP-2. The expression of $\text{Na}_v1.6$ channels in cervical cancer could therefore represent a molecular target for reducing the metastasis of this carcinoma.

Methods

Ethics Statement. This research protocol was approved by the Scientific and Ethics Committees of the Hospital General de México (approval number DIC/03/311/04/051) and was performed in accordance with the ethical principles described in the 1964 Declaration of Helsinki. Informed written consent was obtained from all participants prior to their inclusion in the study.

Human Biopsies. This study included 57 samples from cervical cancer patients distributed as follows: 35 positive to HPV16; 22 positive for the other major HPV oncogenic types (HPV18, 31, 45, 52, 58, 59 and 68); 26 samples from low-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN-1); 17 from high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN-2/3); and 19 non-cancerous cervical samples (NCC). All samples were obtained at the Oncology Unit of the Hospital General de Mexico, and they were selected from patients with an incident case and who had not received any anticancer therapy. Non-cancerous cervical biopsies were obtained by hysterectomy from patients with uterine myomatosis and with Pap smear test negative to cancer. HPV detection and typing in all specimens were performed as described previously⁶⁵. All patients were histopathologically diagnosed and the cervical cancer stage was determined according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) staging system. After sampling, all patients were referred for specific treatments according to the guidelines of the American Cancer Society.

RNA extraction, Reverse Transcription and Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR). Biopsies from human cervical tissue were surgically sampling using a Schubert tweezer. Each biopsy was placed immediately in a sterile plastic Petri dish containing 4°C Hank's solution supplemented with 2 mM glutamine, penicillin (50 U/ml) and streptomycin (50 µg/ml). The biopsies were transported on ice to the laboratory for processing. Samples were transferred into a sterile Petri dish to remove and discard damaged areas using a scalpel. Each tissue sample was cut in small pieces of approximately 5-mm and then transferred into a mortar containing liquid nitrogen followed by a vigorous trituration until get a fine powder of tissue. Finally, an adequate volume of TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA) was added to the pulverized tissue and total RNA isolation was performed according to the manufacturer's protocol. Total RNA from cell lines was obtained using the same procedure. After total RNA isolation the remaining interphase and the organic phenol-chloroform phase were stored for further DNA and protein isolation. The RNA integrity was confirmed by agarose gel electrophoresis by the presence of 28S and 18S ribosomal bands; while RNA yield and purity were determined by spectrophotometry and only those samples with an A_{260}/A_{280} ratio above 1.6 were kept for further experiments. Reverse transcription for 3 µg of total RNA was carried out using the High-Capacity kit (Applied Biosystems; Foster City, CA) in 20 µl of final volume according to the manufacturer's specifications. Gene expression of SCN8A was assessed in all samples by quantitative RT-PCR using TaqMan probes (Applied Biosystems), as we have reported previously²⁵. Genes for 18S, GAPDH and HPRT1 were used as internal controls. Experiments were run in triplicates in a final volume of 20 µl, including 200 ng of cDNA template, 10 µl of 2 × TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1 µl of 20 × TaqMan Gene Expression Assay and 7 µl of water. Cycling was carried out using a Rotor-Gene thermocycler (Qiagen; Hilden, Germany) with the following conditions: a PCR activation step at 50°C for 2 min followed by 95°C for 10 min, then 40 cycles of melting at 95°C for 15 s and annealing/extension at 60°C for 1 min. Evaluation of gene expression was based on relative standard curves constructed from a 10-fold serially diluted pool of CeCa cDNAs ranging from 500 to 0.05 ng. The expression of SCN8A gene was normalized in each sample to the expression of internal standard gene and relative expression levels were calculated using comparative $2^{-\Delta\Delta CT}$ method as described previously²⁵.

Identification of SCN8A splice variants in human cervical tissue. Total RNA from human biopsies of non-cancerous cervix, cervical intraepithelial neoplasia, invasive cervical cancer and cervical cancer cell lines was isolated using the TRIzol Reagent. First strand cDNA synthesis was performed from 3 µg total RNA using the High-Capacity kit (Applied Biosystems) in 20 µl of final volume according to the manufacturer's specifications. The first strand cDNA product (250 ng) was used as template in 10 µl PCR reactions with final concentrations of 200 µM dNTP, 0.3 µM primers for SCN8A Exon 18 (forward primer 5'-AAGTGGAACAGCCTATGGCTTCG-3', reverse primer 5'-TGTGACATCTCAATTCAAATCGG-3'), 1.5 mM MgCl₂, and 1.3 U of enzyme mix (Expand High Fidelity PCR System, Roche Diagnostics; Mannheim, Germany). A single round of amplification (35 cycles) was initiated by denaturation for 2 min at 95°C followed by 45 sec at 95°C, 30 sec at 60°C and 30 sec at 72°C. A final extension step by 4 min at 72°C was included. PCR products of SCN8A splice variants were electrophoretically separated in 2% agarose gels and visualized by ethidium bromide fluorescence. The identity of each splice variant was confirmed by automated sequencing. Full scan of agarose gels are shown in Supplementary Fig. S11.

Culture of cell lines. Human cervical cancer cell lines purchased from the ATCC catalogue were used for studying mechanistic aspects. HeLa (positive to HPV18), SiHa and CaSki (positive to HPV16) and C33A cells (negative to any HPV) were used as cervical cancer models while ordinary HEK-293 and HEK-293 stably expressing human $\text{Na}_v1.6$ channels were used as non-cancerous models. All cell lines were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine and penicillin-streptomycin (Gibco-Thermo Fisher Scientific) at 37°C in a CO₂ incubator.

Protein Extraction and Western Blotting Experiments. Total protein extracts from human cervical tissues were obtained from stored phases after RNA isolation according to the Protein Isolation Procedure of TRIzol Reagent's user guide. On the other hand, to prepare protein extracts from cell lines, cells were rinsed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in the presence of RIPA buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7; 150 mM NaCl, 1% IGEPAL, 1% sodium deoxycholate, and 1% sodium dodecyl sulfate), containing protease inhibitors cocktail (Roche Diagnostics). Cell lysates were sonicated in a Digital Sonifier (Bransonic Ultrasonics Corp.; Danbury, CT), with 4 short bursts (at 10% amplitude) of 10 sec followed by intervals of 60 sec for cooling on ice. Protein integrity was verified by SDS-PAGE followed by Coomassie's blue staining. Total protein was quantified by Bradford Protein Assay (Bio-Rad; Hercules, CA) using ultra-pure bovine serum albumin (BSA) as standard. For western blotting experiments a 20- μ g samples of protein homogenates were heated at 75 °C for 3 min, and then protein samples were separated by 8% SDS-PAGE under reducing conditions and then transferred to polyvinylidene fluoride membranes (Millipore; Burlington, MA). The membranes were blocked with 5% non-fat milk in TBST buffer (100 mM Tris, 150 mM NaCl and 0.1% Tween-20) for 3 hours. Work dilutions for primary antibodies were as follow: anti-Na_v1.6, 1:5000 (Alomone Labs, Israel; ASC-009); anti-GAPDH, 1:1000 (GeneTex; Irvine, CA; GTx100118); anti-HSC70, 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, SC-7298); anti-Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX), 1:1000 (GeneTex, GTx80928); anti-Histone-3, 1:1000 (GeneTex, GTx122148); anti-MMP2, 1:1000 (GeneTex, GTx104577); anti-MMP9, 1:1000 (GeneTex, GTx100458); anti-proMMP2, 1:1000 (Abcam, AB37150) and anti-NHE-1, 1:800 (GeneTex, GTx85046). Incubation with primary antibodies was performed overnight at 4 °C on a shaker. Membranes were then washed three times for 15-min continuous stirring each with TBST and incubated with secondary antibodies (1:10000) for 1 hour at room temperature. After washing again the blots with TBST, immunodetection was performed using electrochemiluminescence-plus kit (Thermo Fisher Scientific), and protein bands signal was captured on Kodak Bio-Mark MS films. Finally, X-ray films with protein bands were digitalized by a scanner and stored as high-quality images. Densitometry analysis of protein bands was performed using the Gel Tool from Fiji software⁶⁶. Full scan of western blots are shown in Supplementary Fig. S11.

Preparation of cytoplasmic and nuclear extracts. Cervical cancer cells were grown in 100-mm Petri dish until cells reached 90% confluence. Cells were then lysed with 200- μ l *cytoplasmic buffer* (10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 10 mM NaCl, 6 mM MgCl₂, 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM DTT, and 1 mM PMSF), and stirred for 5 min at 4 °C and then pelleted at 2600 rpm for 15 min at 4 °C. Supernatants recovered were labeled as cytoplasmic fraction. Pellets were washed twice with ice cold PBS. Pellets were resuspended in 40- μ l *nuclear buffer* (20 mM HEPES, pH 7.9; 420 mM NaCl, 20% glycerol, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF), and vortexed for 15 min at 4 °C. Nuclear extracts were recovered by centrifugation at 12,000 rpm for 15 min at 4 °C.

Immunohistochemistry. The protein expression of the Na_v1.6 channels in the human cervical tissues was analyzed by standard immunohistochemistry procedure. Several homemade tissue microarrays (TMA) were built containing samples from dysplasia, tumor and non-cancerous tissue at the same slide. TMA stained by H&E were analyzed in blind conditions by two pathologist experts for proper staging. After deparaffinization and rehydration of paraffin-embedded tissue, the sections were treated with a high-pH (Tris buffer/EDTA, pH 9.0) target retrieval procedure (Dako PT-link, Dako; Santa Clara, CA). Endogenous peroxidase was then blocked by a commercial solution (Dako REAL, Dako) and incubated overnight at 4 °C with a rabbit-anti-Na_v1.6 primary antibody (1:150; Alomone). Sections were then incubated with HRP-conjugated anti-rabbit secondary antibody (GeneTex) for 1 hour at room temperature. Immunoreaction was finally revealed by oxidation of 3,3-diaminobenzidine solution (Dako) during 5 min. Positive reaction was identified by a dark-brown precipitate. To determine the degree of protein expression in tissues, a qualitative scale was used, for negative (-), weak (+) and strong (++) signal intensity. A unique score was given per core. Negative controls were obtained using an irrelevant antibody instead of anti-Na_v1.6 primary antibody. Finally, the slides were counterstained with hematoxylin and subjected to a fast dehydration process. Digital images were acquired using a light-transmitted microscope Leica ICC50 (Leica Microsystems; Wetzlar, Germany) and stored as high-quality images for documentation and later analysis.

Immunofluorescence and Confocal Microscopy. For cell monolayer immunofluorescence experiments, five thousand cells were seeded on coverslips or 35 mm glass bottom dish (Ibidi; Munich, Germany) and incubated at 37 °C, 5% CO₂ for 24 h. Cell monolayers were rinsed twice with PBS, fixed with 3.7% ice-cold paraformaldehyde in PBS. Tissue slides and cell monolayers were permeabilized with PBS supplemented with 100 mM glycine, 1% BSA and 0.2% Triton X-100 at room temperature for 30 min in a shaker. After three washes with PBS for 5 min each, preparations were blocked for 1 hour with PBS supplemented with 300 mM glycine, 3% BSA and 0.2% Triton X-100 at room temperature under continuous stirring. Primary antibody was diluted in PBS supplemented with 10% FBS and 0.2% Triton X-100 and incubated overnight at 4 °C in a humidified chamber. Three washes with PBS for 10 min each were performed for removing non-specific primary antibody binding. FITC-coupled secondary antibody was diluted in PBS supplemented with 10% FBS and 0.2% Triton X-100 and incubated for 1 hour at room temperature. Again, preparations were washed three times with PBS, incubated with DAPI for 5 min, and washed again with PBS before sealed with Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako), while preparations from 35 mm glass bottom dish were maintained in PBS. Negative controls were obtained by pre-incubation of anti-Na_v1.6 with the immunogenic peptide before primary antibody incubation step. Preparations were observed using a Zeiss LSM 800 confocal microscope with 405 nm and 514 nm laser lines, imaged through a 63× DIC 1.4 oil objective. Images were acquired with sequential excitation as stacks with 0.3 μ m z-spacing. Detector gain and laser power were kept constant for all samples.

Electrophysiology. Cervical cancer cells were co-transfected with plasmids containing $\text{Na}_v1.6$ and GFP genes using JetPEI reagent (Polyplus transfectionTM; Illrich, France). After transfection, cells were cultured for 36 h before electrophysiological experiments. Transfected cells were trypsinized and seeded on coverslips contained into a 35-mm Petri dish. Electrophysiological recordings were carried out between 2 and 10 h after seeding. The macroscopic activity of $\text{Na}_v1.6$ channels was examined using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. Sodium currents were obtained at 21 °C using an Axopatch 200B amplifier, a Digidata1322a A/D converter and pCLAMP 9.4 software (Molecular Devices; Sunnyvale, CA). Currents were digitalized at 10 to 20 kHz, after 5 kHz analogue filtering. Whole-cell series resistance and cell capacitance were estimated from optimal cancellation of the capacitive transients with the built-in circuitry of the amplifier and in some cases was compensated electrically by 60 to 70%. Cells were bathed in a solution containing the following composition (in mM): 158 NaCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂ and 10 HEPES-NaOH (pH 7.4). Internal recording solution contained the following composition (in mM): 106 CsCl, 30 NaCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 EGTA and 10 HEPES-CsOH (pH 7.3).

Voltage-gated sodium currents were evoked by 16-ms depolarizing pulses to 0 mV from a holding potential of -100 mV applied every 10 s. The protocol used to build sodium current-voltage (I - V) relationships was as follows: plasma membrane was held at -100 mV and then stepped to potentials from -80 to +80 mV, in 5-mV increments, by applying brief (16 ms) depolarizations at a frequency of 0.1 Hz. Current amplitudes were normalized to cell capacitance and expressed as current density (pA/pF). Activation curves of Na^+ channels were constructed by calculating the Na^+ conductance at each test potential by dividing peak current amplitude by the respective driving force ($V_m - V_{\text{rev}}$). Then, conductance was normalized to its maximal value and plotted against V_m . Data points were fitted with a Boltzmann function: $G = G_{\max}/(1 + \exp(-(V_m - V_{1/2})/k))$, where G_{\max} is the maximum Na^+ conductance; V_m is the test potential, $V_{1/2}$ is the mid-point of activation, and k is the slope factor.

Invasion Assay. Invasion assays were performed using the Corning® Matrigel® 24-well collagen-based cell invasion chamber with 8-μm pore size as described previously²⁵. Briefly, cervical cancer cells were co-transfected with plasmids containing $\text{Na}_v1.6$ and GFP genes and seeded in the inserts at 1×10^5 cells density using culture medium with 5% FBS in absence or presence of 1-μM TTX, or in presence of protease inhibitors: GM6001, 25 μM (Millipore); E-64, 100 μM (Calbiochem; San Diego, CA); Leupeptin, 100 μM (Thermo Fisher Scientific), or the NHE-1 specific inhibitor 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride, EIPA, 1 μM (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO). The lower chamber contained 500 μl of enriched culture medium with 15% FBS. Cancer cells transfected only with GFP and undergone trough the same procedure were used as a control. Chambers were incubated for 48 h at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. Cells on upper surface of membranes were removed with cotton swabs. Cells on the lower surface were incubated for 3 h in 400 μl fresh culture medium supplemented with MTT reagent. After incubation, culture medium was removed and tetrazolium salts formed were dissolved with 350 μl DMSO. Number of invasive cells was estimated by absorbance measurement at 570 nm, or in a few cases, invasive cells were fixed with absolute methanol at -20 °C for 10 min, stained with DAPI and photographed using an inverted microscope. Cells were counted automatically using the bright-clustered spot detection tool from NIS-Elements Advanced Research Imaging Software (Nikon, Japan). In all cases, three independent experiments were performed in triplicates.

Scratch-Wound Assay. Monolayer cultures of cervical cancer cells co-transfected with plasmids containing $\text{Na}_v1.6$ and GFP genes were treated for 2 h with 12 μM mitomycin C, then they were scratch-wounded using a sterile 10 μl pipette tip, washed twice with PBS and fed with fresh culture medium in the absence or the presence of 1 μM TTX. Cancer cells transfected only with GFP and undergone to the same procedure were used as a control. Simultaneously, cervical cancer cells without undergoing to transfection procedure and incubated in high-serum culture medium were used as positive control. Three independent experiments were performed in triplicates. Progress of cell migration into the wound was photographed using an IX71 Olympus inverted microscope coupled to an acquisition system Evolution VF Fast Cooled Color Camera. Cell migration (expressed as the migration rate: original scratch area - new scratch area)/original scratch área × 100%) was quantified using the polygon tool from Fiji software⁶⁶.

Proliferation Assay. Cervical cancer cells co-transfected with plasmids containing $\text{Na}_v1.6$ and GFP genes were seeded by triplicate at 5×10^3 cells/well in a 48-well plate and grown for a total of 96 h in absence or presence of 1 μM TTX. Cancer cells transfected only with GFP and undergone to the same procedure were used as a control. Culture medium and TTX were changed every day. Cell proliferation was measured by the tetrazolium salt assay. Briefly, MTT reagent was added after each incubation time and incubated for 3 h. Then, culture medium was removed and tetrazolium salts were dissolved with 300 μl DMSO. Cell proliferation was estimated by absorbance measurement at 570 nm using DMSO as blank. Three independent experiments were performed.

Zymography. Conditioned mediums obtained from cervical cancer cells co-transfected with plasmids containing $\text{Na}_v1.6$ and GFP genes were concentrated using Amicon® ultra centrifuge filters (Merck Millipore). A conditioned medium as positive control was obtained from MCF-7 cells treated with 100 ng/ml phorbol 12, 13-dibutyrate (PDB) for 40 h. Equal volume of non-heated samples were mixed with sample buffer (2.5% SDS, 1% sucrose, 4-μg/ml phenol red) without reducing agents. Samples were electrophoretically separated in 8% polyacrylamide gels copolymerized with gelatin (1 mg/ml). Gels were rinsed twice with 2.5% Triton X-100 and incubated in activity buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; and 5 mM CaCl₂) at 37 °C for 48 h. Gels were fixed and stained with 0.25% Coomassie Brilliant Blue G-250 in 10% acetic acid and 30% methanol. Proteolytic activity was detected as clear bands against the background blue stain of undigested substrate. Full scan of gelatin zymographies are shown in Supplementary Fig. S11.

Statistical analysis. Quantitative results are given as the mean \pm standard error (SEM) or standard deviation (SD). Differences in means were tested with an unpaired two-tailed Student's *t* test and were accepted as significant if $P < 0.05$. Alternatively, a Mann-Whitney U test was used when the variance homogeneity test failed. Receiver Operator Characteristic (ROC) curve analysis was performed to select the best cut-off points to distinguish invasive tumors from controls as described previously⁶⁵. Data analysis and graphing were performed using GraphPad Prism version 6.01 for Windows (La Jolla, CA) and SPSS version 17.0 software.

Data Availability

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

- Roden, R. & Wu, T. C. How will HPV vaccines affect cervical cancer? *Nat Rev Cancer* **6**, 753–763, <https://doi.org/10.1038/nrc1973> (2006).
- Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* **136**, E359–386, <https://doi.org/10.1002/ijc.29210> (2015).
- Subramaniam, A. *et al.* Invasive cervical cancer and screening: what are the rates of unscreened and underscreened women in the modern era? *J Low Genit Tract Dis* **15**, 110–113 (2011).
- Rauvala, M. *et al.* Matrix metalloproteinases-2 and -9 in cervical cancer: different roles in tumor progression. *Inter J Gynecol Cancer* **16**, 1297–1302 (2006).
- Sheu, B. C. *et al.* Increased expression and activation of gelatinolytic matrix metalloproteinases is associated with the progression and recurrence of human cervical cancer. *Cancer Res* **63**, 6537–6542 (2003).
- Gialeli, C., Theocharis, A. D. & Karamanos, N. K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *Febs J* **278**, 16–27, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x> (2011).
- Catterall, W. A. Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *J Physiol* **590**, 2577–2589, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.224204> (2012).
- Black, J. A. & Waxman, S. G. Noncanonical Roles of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron* **80**, 280–291, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.012> (2013).
- Roger, S., Gillet, L., Le Guennec, J. Y. & Besson, P. Voltage-gated sodium channels and cancer: is excitability their primary role? *Front Pharmacol* **6**, <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00152> (2015).
- Xia, J. L. *et al.* Voltage-gated sodium channel Na(v)1.7 promotes gastric cancer progression through MACC1-mediated upregulation of NHE1. *Int J Cancer* **139**, 2553–2569, <https://doi.org/10.1002/ijc.30381> (2016).
- Fraser, S. P. *et al.* T-lymphocyte invasiveness: control by voltage-gated Na⁺ channel activity. *FEBS Lett* **569**, 191–194, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.05.063> (2004).
- Fraser, S. P. *et al.* Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* **11**, 5381–5389, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0327> (2005).
- Gao, R., Shen, Y., Cai, J., Lei, M. & Wang, Z. Expression of voltage-gated sodium channel alpha subunit in human ovarian cancer. *Oncol Rep* **23**, 1293–1299, https://doi.org/10.3892/or_00000763 (2010).
- House, C. D. *et al.* Voltage-gated Na⁺ channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion. *Cancer Res* **70**, 6957–6967, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1169> (2010).
- Laniado, M. E. *et al.* Expression and functional analysis of voltage-activated Na⁺ channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion *in vitro*. *Am J Pathol* **150**, 1213–1221 (1997).
- Roger, S., Besson, P. & Le Guennec, J. Y. Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. *Biochim Biophys Acta* **1616**, 107–111, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2003.07.001> (2003).
- Roger, S. *et al.* 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, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.12.007> (2007).
- Brisson, L. *et al.* NaV1.5 Na(+) channels allosterically regulate the NHE-1 exchanger and promote the activity of breast cancer cell invadopodia. *J Cell Sci* **126**, 4835–4842, <https://doi.org/10.1242/jcs.123901> (2013).
- Brisson, L. *et al.* Na(V)1.5 enhances breast cancer cell invasiveness by increasing NHE1-dependent H(+) efflux in caveolae. *Oncogene* **30**, 2070–2076, <https://doi.org/10.1038/onc.2010.574> (2011).
- Gillet, L. *et al.* Voltage-gated Sodium Channel Activity Promotes Cysteine Cathepsin-dependent Invasiveness and Colony Growth of Human Cancer Cells. *J Biol Chem* **284**, 8680–8691, <https://doi.org/10.1074/jbc.M806891200> (2009).
- Yang, M. *et al.* Therapeutic potential for phenytoin: targeting Na(v)1.5 sodium channels to reduce migration and invasion in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **134**, 603–615, <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2102-9> (2012).
- Bon, E. *et al.* SCN4B acts as a metastasis-suppressor gene preventing hyperactivation of cell migration in breast cancer. *Nature Communications* **7**, 13648, <https://doi.org/10.1038/ncomms13648> (2016).
- Carrithers, M. D. *et al.* Regulation of Podosome Formation in Macrophages by a Splice Variant of the Sodium Channel SCN8A. *J Biol Chem* **284**, 8114–8126, <https://doi.org/10.1074/jbc.M801892200> (2009).
- Diaz, D. *et al.* Functional expression of voltage-gated sodium channels in primary cultures of human cervical cancer. *J Cell Physiol* **210**, 469–478 (2007).
- Hernandez-Plata, E. *et al.* Overexpression of NaV1.6 channels is associated with the invasion capacity of human cervical cancer. *Int J Cancer* **130**, 2013–2023, <https://doi.org/10.1002/ijc.26210> (2012).
- Caldwell, J. H., Schaller, K. L., Lasher, R. S., Peles, E. & Levinson, S. R. Sodium channel Na(v)1.6 is localized at nodes of Ranvier, dendrites, and synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 5616–5620, <https://doi.org/10.1073/pnas.090034797> (2000).
- Levin, S. I. *et al.* Impaired motor function in mice with cell-specific knockout of sodium channel Scn8a (NaV1.6) in cerebellar Purkinje neurons and granule cells. *J Neurophysiol* **96**, 785–793, <https://doi.org/10.1152/jn.01193.2005> (2006).
- Trudeau, M. M., Dalton, J. C., Day, J. W., Ranum, L. P. & Meisler, M. H. Heterozygosity for a protein truncation mutation of sodium channel SCN8A in a patient with cerebellar atrophy, ataxia, and mental retardation. *J Med Genet* **43**, 527–530, <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.035667> (2006).
- Black, J. A., Liu, S. & Waxman, S. G. Sodium channel activity modulates multiple functions in microglia. *Glia* **57**, 1072–1081, <https://doi.org/10.1002/glia.20830> (2009).
- Craner, M. J. *et al.* Sodium channels contribute to microglia/macrophage activation and function in EAE and MS. *Glia* **49**, 220–229, <https://doi.org/10.1002/glia.20112> (2005).
- Traub, O., Ishida, T., Ishida, M., Tupper, J. C. & Berk, B. C. Shear stress-mediated extracellular signal-regulated kinase activation is regulated by sodium in endothelial cells. Potential role for a voltage-dependent sodium channel. *J Biol Chem* **274**, 20144–20150 (1999).
- Zhao, P. *et al.* Voltage-gated sodium channel expression in rat and human epidermal keratinocytes: evidence for a role in pain. *Pain* **139**, 90–105 (2008).

33. Li, G. R. *et al.* Characterization of Multiple Ion Channels in Cultured Human Cardiac Fibroblasts. *PLoS One* **4** <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007307> (2009).
34. Diss, J. K. *et al.* A potential novel marker for human prostate cancer: voltage-gated sodium channel expression *in vivo*. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **8**, 266–273, <https://doi.org/10.1038/sj.pcan.4500796> (2005).
35. Mayrand, M. *et al.* Human papillomavirus DNA versus papanicolaou screening tests for cervical cancer. *New Engl J Med* **357**, 1579–1588 (2007).
36. Vogel, C. & Marcotte, E. M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet* **13**, 227–232, <https://doi.org/10.1038/nrg3185> (2012).
37. Plummer, N. W., McBurney, M. W. & Meisler, M. H. Alternative splicing of the sodium channel SCN8A predicts a truncated two-domain protein in fetal brain and non-neuronal cells. *J Biol Chem* **272**, 24008–24015 (1997).
38. Burbidge, S. A. *et al.* Molecular cloning, distribution and functional analysis of the NA(V)1.6. Voltage-gated sodium channel from human brain. *Mol Brain Res* **103**, 80–90, [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(02\)00188-2](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(02)00188-2) (2002).
39. Arreola, J., Spires, S. & Begenisich, T. Na⁺ Channels in Cardiac and Neuronal Cells Derived from a Mouse Embryonal Carcinoma Cell-Line. *J Physiol-London* **472**, 289–303 (1993).
40. Kubo, Y. Development of Ion Channels and Neurofilaments during Neuronal Differentiation of Mouse Embryonal Carcinoma Cell-Lines. *J Physiol-London* **409**, 497–523 (1989).
41. Rush, A. M., Dib-Hajj, S. D. & Waxman, S. G. Electrophysiological properties of two axonal sodium channels, Na(v)1.2 and Nav1.6, expressed in mouse spinal sensory neurones. *J Physiol-London* **564**, 803–815, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.083089> (2005).
42. Sanchez-Sandoval, A. L. *Participación de los canales de sodio activados por voltaje en las propiedades metastásicas de líneas celulares de cáncer cervicouterino: regulación por estradiol, EGF y subunidades beta*, M Sc Thesis. Universidad Nacional Autónoma de México <http://132.248.9.195/ptd2013/marzo/303298191/Index.html> (2013).
43. Busco, G. *et al.* NHE1 promotes invadopodial ECM proteolysis through acidification of the peri-invadopodial space. *FASEB J* **24**, 3903–3915, <https://doi.org/10.1096/fj.09-149518> (2010).
44. Cardone, R. A., Casavola, V. & Reshkin, S. J. The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis. *Nat Rev Cancer* **5**, 786–795, <https://doi.org/10.1038/nrc1713> (2005).
45. Bourguignon, L. Y. W., Singleton, P. A., Diedrich, F., Stern, R. & Gilad, E. CD44 interaction with Na⁺-H⁺ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *J Biol Chem* **279**, 26991–27007 (2004).
46. Taves, J. *et al.* Sodium hydrogen exchanger and phospholipase D are required for alpha(1)-adrenergic receptor stimulation of metalloproteinase-9 and cellular invasion in CCL39 fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* **477**, 60–66, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.05.007> (2008).
47. Brackenbury, W. J. Voltage-gated sodium channels and metastatic disease. *Channels* **6**, 352–361, <https://doi.org/10.4161/chan.21910> (2012).
48. Crosbie, E. J., Einstein, M. H., Franceschi, S. & Kitchener, H. C. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* **382**, 889–899, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60022-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60022-7) (2013).
49. Carrithers, M. D. *et al.* Expression of the voltage-gated sodium channel NaV1.5 in the macrophage late endosome regulates endosomal acidification. *J Immunol* **178**, 7822–7832, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.7822> (2007).
50. Cestele, S. *et al.* Voltage sensor-trapping: Enhanced activation of sodium channels by beta-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. *Neuron* **21**, 919–931, [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80606-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80606-6) (1998).
51. de la Vega, R. C. & Possani, L. D. Novel paradigms on scorpion toxins that affects the activating mechanism of sodium channels. *Toxicicon* **49**, 171–180, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.09.016> (2007).
52. Ding, Y. & Djamgoz, M. B. A. Serum concentration modifies amplitude and kinetics of voltage-gated Na(+) current in the Mat-LyLu cell line of rat prostate cancer. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 1249–1260, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.10.010> (2004).
53. Xing, D. G. *et al.* Expression of neonatal Nav1.5 in human brain astrocytoma and its effect on proliferation, invasion and apoptosis of astrocytoma cells. *Oncol Rep* **31**, 2692–2700, <https://doi.org/10.3892/onc.2014.3143> (2014).
54. Anderson, J. D. *et al.* Voltage-gated sodium channel blockers as cytostatic inhibitors of the androgen-independent prostate cancer cell line PC-3. *Mol Cancer Ther* **2**, 1149–1154 (2003).
55. Mohammed, F. H., Khajah, M. A., Yang, M., Brackenbury, W. J. & Luqmani, Y. A. Blockade of voltage-gated sodium channels inhibits invasion of endocrine-resistant breast cancer cells. *Int J Oncol* **48**, 73–83, <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3239> (2016).
56. Zucker, S., Cao, J. & Chen, W. T. Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Oncogene* **19**, 6642–6650, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204097> (2000).
57. Moss, L. A. S., Jensen-Taubman, S. & Stettler-Stevenson, W. G. Matrix Metalloproteinases Changing Roles in Tumor Progression and Metastasis. *Am J Pathol* **181**, 1895–1899, <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.08.044> (2012).
58. Vinnakota, K. *et al.* M2-like macrophages induce colon cancer cell invasion via matrix metalloproteinases. *J Cell Physiol* **232**, 3468–3480, <https://doi.org/10.1002/jcp.25808> (2017).
59. Ariyoshi, W., Okinaga, T., Chawewannakorn, W., Akifusa, S. & Nishihara, T. Mechanisms involved in enhancement of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages by interleukin-33. *J Cell Physiol* **232**, 3481–3495, <https://doi.org/10.1002/jcp.25809> (2017).
60. Zucker, S. & Vacirca, J. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metast Rev* **23**, 101–117 (2004).
61. Murphy, D. A. & Courtneidge, S. A. The ‘ins’ and ‘outs’ of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 413–426, <https://doi.org/10.1038/nrm3141> (2011).
62. Yang, X. K., Wang, D. S., Dong, W., Song, Z. S. & Dou, K. F. Expression and modulation of Na⁺/H⁺ exchanger 1 gene in hepatocellular carcinoma: A potential therapeutic target. *J Gastroen Hepatol* **26**, 364–370, <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2010.06382.x> (2011).
63. Cong, D. M. *et al.* Upregulation of NHE1 protein expression enables glioblastoma cells to escape TMZ-mediated toxicity via increased H⁺ extrusion, cell migration and survival. *Carcinogenesis* **35**, 2014–2024, <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu089> (2014).
64. Hossain, M. M., Sonsalla, P. K. & Richardson, J. R. Coordinated role of voltage-gated sodium channels and the Na⁺/H⁺ exchanger in sustaining microglial activation during inflammation. *Toxicol Appl Pharm* **273**, 355–364, <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.09.011> (2013).
65. Espinosa, A. M. *et al.* Mitosis is a source of potential markers for screening and survival and therapeutic targets in cervical cancer. *PLoS one* **8**, e55975, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055975> (2013).
66. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**, 676–682, <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019> (2012).

Acknowledgements

This work was supported by CONACYT-MEXICO 167790 and PAPIIT-UNAM IN207614 and IN206917. Osbaldo Lopez-Chacras is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 369878 from CONACYT. B.E.R.C. wants to thank the postdoctoral grant from DGAPA-UNAM. We also thank M Gomora-Garcia for help with the artwork;

L Ongay, G Codiz-Huerta, M Mora-Cabrera, AM Escalante-Gonzalbo, F Perez-Eugenio, F Garcia-Hernandez, and LG Ceballos-Martinez at Instituto de Fisiología Celular, UNAM for the expert technical assistance.

Author Contributions

O.L.C. and J.C.G. conceived the study, designed the experiments and wrote the manuscript. O.L.C., A.M.E., A.A., Z.H.C., B.E.R.C. and P.C.R. conducted the experiments. O.L.C., P.C.R., J.B., E.P.S. and J.C.G. participated in the data analysis. P.C.R., J.B. and E.P.S. performed a critical revision of the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31364-y>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018



Discovery and evaluation of nNa_v1.5 sodium channel blockers with potent cell invasion inhibitory activity in breast cancer cells



Shilpa Dutta ^{a,b}, Osbaldo Lopez Charcas ^c, Samuel Tanner ^{a,b}, Frédéric Gradek ^c, Virginie Driffort ^c, Sébastien Roger ^{c,d}, Katri Selander ^e, Sadanandan E. Velu ^{a,b,*}, Wayne Brouillette ^{a,b,*}

^a Department of Chemistry, University of Alabama at Birmingham, 901 14th Street South, Birmingham, AL 35294-1240, USA

^b Center for Biophysical Sciences and Engineering, University of Alabama at Birmingham, 1025 18th Street South, Birmingham, AL 35294-1240, USA

^c Inserm UMR1069, Nutrition, Croissance et Cancer, Université de Tours, Faculté de médecine, 10 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours, Cedex, France

^d Institut Universitaire de France, 1, rue Descartes, 75231 Paris Cedex 05, France

^e Division of Hematology and Oncology, Department of Medicine, University of Alabama at Birmingham, 1808 7th Ave S, Birmingham, AL 35294-0012, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 November 2017

Revised 25 March 2018

Accepted 1 April 2018

Available online 3 April 2018

Keywords:

Breast cancer

nNa_v1.5

Voltage-gated sodium channel

Sodium current

Cancer cell invasion

Metastasis

ABSTRACT

Voltage-gated sodium channels (VGSC) are a well-established drug target for anti-epileptic, anti-arrhythmic and pain medications due to their presence and the important roles that they play in excitable cells. Recently, their presence has been recognized in non-excitable cells such as cancer cells and their overexpression has been shown to be associated with metastatic behavior in a variety of human cancers. The neonatal isoform of the VGSC subtype, Na_v1.5 (nNa_v1.5) is overexpressed in the highly aggressive human breast cancer cell line, MDA-MB-231. The activity of nNa_v1.5 is known to promote the breast cancer cell invasion *in vitro* and metastasis *in vivo*, and its expression in primary mammary tumors has been associated with metastasis and patient death. Metastasis development is responsible for the high mortality of breast cancer and currently there is no treatment available to specifically prevent or inhibit breast cancer metastasis. In the present study, a 3D-QSAR model is used to assist the development of low micromolar small molecule VGSC blockers. Using this model, we have designed, synthesized and evaluated five small molecule compounds as blockers of nNa_v1.5-dependent inward currents in whole-cell patch-clamp experiments in MDA-MB-231 cells. The most active compound identified from these studies blocked sodium currents by $34.9 \pm 6.6\%$ at $1 \mu\text{M}$. This compound also inhibited the invasion of MDA-MB-231 cells by $30.3 \pm 4.5\%$ at $1 \mu\text{M}$ concentration without affecting the cell viability. The potent small molecule compounds presented here have the potential to be developed as drugs for breast cancer metastasis treatment.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Despite the increased awareness and advances in treatment, breast cancer remains as the leading cause of cancer death in women.^{1,2} Though the survival rate for patients diagnosed with localized breast cancer has improved significantly, it is the meta-

static form of the disease that is mainly associated with mortality.^{3,4} Metastasis development has a complex mechanism which involves the acquisition of the ability by cancer cells to degrade and migrate through extracellular matrices (ECM) to distant tissues.^{5–7} The biggest hurdle in controlling breast cancer associated mortality is the lack of proper treatment for metastasis targeting

Abbreviations: CDCl₃, Deuterated chloroform; CH₂Cl₂, Methylene dichloride; ¹³C NMR, Carbon-13 nuclear magnetic resonance; CoMFA, Comparative molecular field analysis; CuBr·Me₂S, Copper bromide dimethyl sulfide; DMEM, Dulbecco's modified eagle medium; DMSO, Dimethyl sulfoxide; 3D-QSAR, 3-Dimensional quantitative structure activity relationship; Et₃N, Triethylamine; EtOAc, Ethyl acetate; ER, Estrogen receptor; FBS, fetal bovine serum; HER-2, Human epidermal growth receptor 2; ¹H NMR, Hydrogen-1 nuclear magnetic resonance; IC₅₀, Inhibition concentration at 50%; I_{Na}, Sodium currents; MeOH, Methanol; MTS, [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]; NaBH(OAc)₃, Sodium triacetoxyborohydride; nNa_v1.5, Neonatal Na_v1.5 isoform; Na₂SO₄, Sodium sulfate; NH₃, Ammonia; NHE1, Na⁺/H⁺ exchanger type 1; NMR, Nuclear magnetic resonance; PBS, Phosphate buffered saline; pH, Intracellular pH; ppm, Parts per million; PR, Progesterone receptor; PSS, Physiological saline solution; Rf, Retention factor; THF, Tetrahydrofuran; TMS, Tetramethylsilane; TLC, Thin layer chromatography; TTX, Tetrodotoxin; UV, Ultraviolet; VGSC, Voltage-gated sodium channels.

* Corresponding authors at: Department of Chemistry, University of Alabama at Birmingham, 901 14th Street South, Birmingham, AL 35294-1240, USA.

E-mail addresses: svelu@uab.edu (S.E. Velu), wbrou@uab.edu (W. Brouillette).

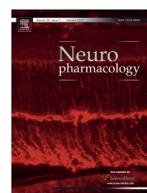


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Neuropharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neuropharm



Novel TASK channels inhibitors derived from dihydropyrrolo[2,1-*a*]isoquinoline



R. Noriega-Navarro ^a, O. Lopez-Charcas ^b, B. Hernández-Enríquez ^c, P.E. Reyes-Gutiérrez ^d, R. Martínez ^d, A. Landa ^e, J. Morán ^c, J.C. Gomora ^b, J. García-Valdes ^{a,*}

^a Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, México City 04510, Mexico

^b Departamento de Neuropatología Molecular, División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, México City 04510, Mexico

^c Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología, División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, México City 04510, Mexico

^d Departamento de Química Orgánica, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, México City 04510, Mexico

^e Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, México City 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 May 2012

Received in revised form

22 October 2013

Accepted 27 October 2013

Keywords:

TASK channels

DPI

Dihydropyrrolo[2,1-*a*]isoquinoline

Apoptosis

Leak channels

ABSTRACT

TASK channels belong to the family of K⁺ channels with 4 transmembrane segments and 2 pore domains (4TM/2P) per subunit. These channels have been related to apoptosis in cerebellar granule neurons (CGN), as well as cancer in other tissues. TASK current is regulated by hormones, neurotransmitters, anesthetics and divalent cations, which are not selective. Recently, there has been found some organic compounds that inhibit TASK current selectively. In order to find other modulators, we report here a group of five dihydropyrrolo[2,1-*a*]isoquinolines (DPIs), four of them with putative anticancer activity, that were evaluated on TASK-1 and TASK-3 channels. The compounds **1**, **2** and **3** showed IC₅₀ < 320 μM on TASK-1 and TASK-3, intermediate activity on TASK-1/TASK-3 heterodimer, moderate effect over h_{SKO} and TREK-1 (500 μM), and practically not inhibition on Shaker-IR, herg and IRK2.1 potassium channels, when they were expressed heterologously in *Xenopus laevis* oocytes. In rat CGN, 500 μM of these three compounds induced a decrement by >39% of the TASK-carried leak current. Finally, only compound **1** showed significant protection (~36%) against apoptotic death of CGN induced by K⁺ deprivation. These results suggest that DPI compounds could be potential candidates for designing new selective inhibitors of TASK channels.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The K⁺ channels show a wide diversity in gating mechanisms, conductance and pharmacological properties. These channels are classified according to the number of both transmembrane regions (TM) and loop pore-forming domains (P) of the α-subunit (Hille, 2001). Among them there is a subfamily of leak channels containing four transmembrane segments and two pore domains (4TM/2P). Channels are assembled by two α-subunits and until today there are 15 members (Enyedi and Czirják, 2010). Two of them are

sensitive to extracellular pH, so they are dubbed as TASK (TWIK¹-related Acid-Sensitive K⁺ channels). TASK-1 (Duprat et al., 1997) and TASK-3 (Kim et al., 2000) show 54% sequence identity between them, but only ~30% with other 4TM/2P channels.

TASK channels are responsible for background or leak K⁺ current, which is outwardly rectifying and practically non-inactivated. They are always opened and contribute for setting the resting membrane potential in cells that express them (Talley et al., 2000; Washburn et al., 2002). TASK channels are expressed in several tissues (Duprat et al., 1997; Kim et al., 2000) including the cerebellum in the central nervous system (Chapman et al., 2000; Leonoudakis et al., 1998). In cerebellar granule neurons (CGN) cultures, TASK channels contribute with more than 50% of the standing outward K⁺ current (IK_{SO}) (Clarke et al., 2004; Han et al., 2002; Kang et al., 2003; Millar et al., 2000) and they are also related

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56223899x44139; fax: +52 55 56223723.
E-mail address: jesusgv@unam.mx (J. García-Valdes).

¹ TWIK:Tandem 2P domain, Weak Inward rectifier K⁺ channel.

Block of Human Ca_v3 Channels by the Diuretic Amiloride

Osbaldo Lopez-Charcas, Manuel Rivera, and Juan C. Gomora

Departamento de Neuropatología Molecular, División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Distrito Federal, México

Received March 24, 2012; accepted July 5, 2012

ABSTRACT

Previous studies in native T-type currents have suggested the existence of distinct isoforms with dissimilar pharmacology. Amiloride was the first organic blocker to selectively block the native T-type calcium channel, but the potency and mechanism of block of this drug on the three recombinant T-type calcium channels ($\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$, and $\text{Ca}_v3.3$) have not been systematically determined. The aim of the present study was to investigate whether there is differential block of Ca_v3 channels by amiloride, to establish the mechanism of block, and to obtain insights into the amiloride putative binding sites in Ca_v3 channels. By performing whole-cell patch-clamp recordings of human embryonic kidney 293 cells stably expressing human Ca_v3 channels, we found that amiloride blocked the human Ca_v3 channels in a concentration-response manner; the IC_{50} for

$\text{Ca}_v3.2$ channels ($62 \mu\text{M}$) was 13-fold lower than that for $\text{Ca}_v3.1$ and $\text{Ca}_v3.3$. Block is voltage-independent (except for $\text{Ca}_v3.3$ channels) and targets mainly closed-state channels, although a small use-dependent component was observed in $\text{Ca}_v3.1$ channels. In addition, amiloride block of $\text{Ca}_v3.2$ channels is mainly due to an extracellular effect, whereas in $\text{Ca}_v3.1$ and $\text{Ca}_v3.3$ channels, the amiloride inhibition is equally effective from both sides of the membrane. The results demonstrate that amiloride blocks human Ca_v3 channels differentially through a mechanism involving mainly the closed state of the channel and suggest a negative allosteric interaction with at least two putative binding sites with different affinities. The preferential block of $\text{Ca}_v3.2$ channels labels amiloride as the only organic blocker to be selective for any T-type channel.

Introduction

Voltage-gated calcium (Ca_v) channels are crucial mediators of a wide range of physiological functions, including neuronal communication, muscle contraction, hormone secretion, enzyme regulation, and gene transcription (Catterall, 2011). Therefore, these channels are key pharmacological targets in the treatment of disorders such as hypertension, epilepsy, and pain. There are two major classes of Ca_v channels: low-voltage-activated (LVA) and high-voltage-activated (HVA) (Ertel et al., 2000). For the last 25 years, the study of Ca_v channels that carried HVA currents has been aided by the existence of specific blockers for each of the five channels of this family: L, N-P/Q, and R types. Clinically relevant calcium channel blockers, which target HVA channels, are widely used in the treatment of hypertension and include

dihydropyridines, benzothiazepines, and phenylalkylamines (Haller, 2008). Conversely, the systematic study of LVA currents, transported exclusively by T-type channels, has been hindered by the lack of a specific blocker and a delay in the cloning of their molecular substrate, which slowed down research on key aspects of their tissue distribution and pathophysiological roles. With the cloning of three human $\alpha 1$ subunits ($\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$, and $\text{Ca}_v3.3$) that generate LVA or T-type currents (Cribbs et al., 1998; Perez-Reyes et al., 1998; Gomora et al., 2002), the search for selective blockers that discriminate among these channels has become more imperative in this century. Mibepradil, once described as the first organic blocker effective at submicromolar concentrations for native T-type channels (Clozel et al., 1997), inhibits the three recombinant Ca_v3 channels with practically the same potency (Martin et al., 2000).

Amiloride is a potassium-sparing diuretic, first approved for use in 1967 and used in the management of hypertension and congestive heart failure (Bull and Laragh, 1968; Thomas and Thomson, 1983), by targeting the epithelial sodium channel within the distal tubule of the kidney (Garty and Benos, 1988). However, amiloride has been used as a pharmacological tool to distinguish native T-type channels from HVA channels, (Tang et al., 1988; Hirano et al., 1989; Tytgat

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología [Grant J50250Q] and the Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal [Grant PICDS08-28] (to M.R.).

Parts of this work were previously presented: Rivera M, López-Charcas O, and Gomora JC (2011) Amiloride docking to T-type calcium channels. *Proceedings of the 55th Annual Meeting of the Biophysical Society*; 2011 Mar 5–9; Baltimore, MD. The Biophysical Society, Rockville, MD.

Article, publication date, and citation information can be found at <http://molpharm.aspetjournals.org>.

<http://dx.doi.org/10.1124/mol.112.078923>

ABBREVIATIONS: Ca_v , voltage-gated calcium; LVA, low-voltage-activated; HVA, high-voltage-activated; HP, holding potential; HEK, human embryonic kidney; AMI, amiloride.