



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Papel de las subunidades  $\beta$  de los canales de sodio activados por voltaje en el fenotipo cancerígeno de líneas celulares de cáncer cervicouterino positivas a VPH-16 y VPH-18**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

**M. en C. Ana Laura Sánchez Sandoval**

TUTOR PRINCIPAL

**Dr. Juan Carlos Gómora Martínez**

Instituto de Fisiología Celular

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dra. Marcia Hiriart Urdanivia**

Instituto de Fisiología Celular

**Dra. Leticia Rocha Zavaleta**

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad de México. Diciembre, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

JURADO ASIGNADO:

**PRESIDENTE:** Dr. León David Islas Suárez  
**VOCAL** Dr. David Erasmo García Díaz  
**VOCAL:** Dra. Sara Luz Morales Lázaro  
**VOCAL:** Dra. Ana Victoria Vega Salcedo  
**SECRETARIO:** Dr. Jaime Berumen Campos

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**Departamento de Neuropatología Molecular,  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM**

ASESOR:

**Dr. Juan Carlos Gómora Martínez**

SUSTENTANTE:

**M. en C. Ana Laura Sánchez Sandoval**

## RECONOCIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi adorada *alma mater*.

Al Dr. Juan Carlos Gómora Martínez, por ser un gran tutor y amigo, de quien he aprendido infinidad de cosas. ¡Gracias, Dr. Gómora!

A la Dra. Leticia Rocha Zavaleta y a la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia por toda la orientación que me brindaron como parte de mi comité tutor a lo largo del doctorado. Sus observaciones siempre fueron muy acertadas y valiosas para mí.

A la Dra. Zazil Herrera Carrillo, por el apoyo técnico en el laboratorio durante la primera parte de mi proyecto.

Al Dr. Everardo Hernández Plata, por el apoyo técnico en el laboratorio durante la parte final de mi proyecto y por todo el apoyo como compañero y amigo.

A la Dra. Lori Isom, de los EUA, quien amablemente nos proporcionó los plásmidos que contienen la secuencia de las subunidades  $\beta$  de los canales  $Na_v$ .

Al Dr. Mustafa Djamgoz, del Imperial College, por permitirme hacer una estancia en su laboratorio.

Se reconoce el apoyo brindado por la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, en donde se realizó la mayor parte de los experimentos de citometría de flujo.

Se reconoce el apoyo brindado por el Laboratorio Nacional de Canalopatías del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, en donde se realizaron algunos experimentos de citometría. En específico, se reconoce el apoyo de la Dra. Arlet Loza Huerta por su apoyo técnico en dichos experimentos.

A los miembros del jurado de examen, por sus comentarios y observaciones en la revisión de esta tesis.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por apoyarme para la realización de una estancia en el Imperial College, Londres.

Durante los estudios de doctorado gocé de una beca otorgada por CONACYT.

El proyecto fue apoyado por CONACYT (167790), y PAPIIT, por parte de la DGAPA, UNAM (IN208611, IN207614 e IN206917).

# CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	5
Cáncer cervicouterino .....	5
Canales iónicos activados por voltaje .....	8
Canales de sodio activados por voltaje.....	9
Subunidades $\alpha$ de los canales $Na_v$ .....	9
Subunidades $\alpha$ de los canales $Na_v$ en cáncer.....	12
Subunidades $\beta$ de los canales $Na_v$ .....	14
Subunidades $\beta$ de los canales $Na_v$ en cáncer .....	16
<b>ANTECEDENTES DIRECTOS</b> .....	18
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	22
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	22
<b>HIPÓTESIS</b> .....	22
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	23
Cultivos celulares .....	23
Extracción del RNA.....	23
RT-PCR.....	24
RT-PCR en tiempo real (qPCR) .....	25
Sobreexpresión de las subunidades $\beta$ .....	27
Abatimiento de la expresión de subunidades $\beta$ de canales $Na_v$ .....	27
Western blot .....	28
Registros electrofisiológicos .....	29
Ensayos de proliferación.....	31
Análisis del ciclo celular por citometría de flujo .....	31
Ensayos de migración e invasividad.....	33
Análisis de inmunohistoquímica in silico .....	34
Análisis y presentación de datos.....	34
<b>RESULTADOS</b> .....	35
Expresión de las subunidades $Na_v\beta$ en líneas celulares de CaCu. ....	35
Capacidad de proliferación, migración e invasión de las líneas celulares de CaCu en condiciones basales.....	37
Eficiencia de transfección con <i>siRNAs</i> .....	37

Cambios en los niveles de expresión de las $Na_v\beta$ s después de inducir su aumento o abatimiento ....	38
Registro de corrientes de sodio activadas por voltaje en células HeLa y SiHa después de inducir la sobreexpresión o el abatimiento de las $Na_v\beta$ s .....	41
Evaluación de la proliferación de células de CaCu por efecto de la expresión de subunidades $Na_v\beta$ s 46	
Análisis de la participación de $Na_v\beta$ 1 en el ciclo celular de las células SiHa.....	48
Participación de las $Na_v\beta$ s en la migración e invasividad de las células de CaCu .....	51
Análisis <i>in silico</i> de la expresión de $Na_v\beta$ 4 en biopsias de cáncer cervicouterino y cérvix no canceroso .....	54
<b>DISCUSIÓN</b> .....	57
<b>CONCLUSIONES</b> .....	64
<b>REFERENCIAS</b> .....	65
<b>APÉNDICES</b> .....	70

## RESUMEN

Los canales de sodio activados por voltaje (canales  $\text{Nav}$ ) son los responsables de la generación y propagación de los potenciales de acción en células excitables. Los canales  $\text{Nav}$  consisten de una subunidad  $\alpha$  formadora del poro de conducción, y una o más subunidades auxiliares  $\beta$  ( $\text{Nav}\beta$ s). Interesantemente, en los últimos años se ha asociado la sobreexpresión y actividad de las subunidades  $\alpha$  de los canales  $\text{Nav}$  con la capacidad invasiva de un creciente número de tipos de cáncer; sin embargo, a la fecha muy poco se ha descrito sobre la posible participación de las  $\text{Nav}\beta$ s en este comportamiento maligno. Las cuatro subunidades  $\beta$  ( $\text{Nav}\beta$ 1- $\text{Nav}\beta$ 4) conocidas en mamíferos son proteínas multifuncionales que no sólo modulan la expresión, tráfico y función de la subunidad  $\alpha$ , sino que también participan en diversos procesos celulares tales como la adhesión, regulación de la transcripción génica, remodelación del citoesqueleto, e incluso en la apoptosis.

Previamente, nuestro laboratorio reportó la sobreexpresión del canal  $\text{Nav}$ 1.6 en biopsias y cultivos primarios de cáncer cervicouterino (CaCu), así como su contribución a la migración e invasividad de este carcinoma. En el presente trabajo investigamos la expresión de las  $\text{Nav}\beta$ s en las líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa, SiHa y CaSki; y estudiamos su contribución a la proliferación, migración e invasividad por medio de ensayos *in vitro*, tanto en condiciones basales como al incrementar (con cDNAs) o disminuir (con siRNAs) la expresión de las  $\text{Nav}\beta$ s.

Los resultados muestran que las tres líneas celulares de CaCu expresan las cuatro  $\text{Nav}\beta$ s en condiciones basales, es decir, aun en ausencia de subunidades  $\alpha$  funcionales en la membrana plasmática. Además, se demostró que la modificación de la expresión de las  $\text{Nav}\beta$ s por sí misma no promueve la expresión de las subunidades  $\alpha$  funcionales en la membrana de estas células. Interesantemente, la sobreexpresión de  $\text{Nav}\beta$ 1 en células SiHa promovió un aumento en la proliferación, mientras que su disminución resultó en el efecto contrario. Los ensayos *in vitro* indicaron que las subunidades  $\text{Nav}\beta$ 1 y  $\text{Nav}\beta$ 4 regulan de forma negativa la migración y la invasividad respectivamente, en las tres líneas celulares de CaCu. Por último, un análisis *in silico* corroboró la regulación negativa de la expresión de  $\text{Nav}\beta$ 4 en tejidos cervicales vs cervix

no canceroso, apoyando nuestros resultados sobre la participación de Nav $\beta$ 4 como un supresor de la invasividad celular.

En conjunto, los resultados presentados aquí contribuyen a la concepción reciente sobre las Nav $\beta$ s como proteínas multifuncionales involucradas en procesos celulares tales como la regulación de los canales iónicos, la adhesión y la movilidad celular, e incluso en las propiedades metastásicas. Estas funciones no canónicas de las Nav $\beta$ s son independientes de la presencia de subunidades  $\alpha$  de los canales Nav funcionales en la membrana plasmática y pueden representar un nuevo blanco terapéutico para el tratamiento del cáncer cervicouterino.



## ABSTRACT

Voltage-gated sodium ( $\text{Na}_v$ ) channels are known for being responsible of action potential generation and propagation in excitable cells and they are constituted by a single pore forming  $\alpha$ -subunit associated with one or more auxiliary  $\beta$ -subunits ( $\text{Na}_v\beta$ s). Over the past few years, the overexpression and activity of the  $\alpha$  subunits of these channels have also been associated with the invasive capacity of an increasing number of cancer types; however, to date very little has been studied about the possible participation of the  $\text{Na}_v\beta$ s in this malignant behavior. Currently, four  $\beta$ -subunits are known ( $\text{Na}_v\beta$ 1- $\text{Na}_v\beta$ 4) and it is known that they are multifunctional proteins that not only modulate the expression, traffic and function of the  $\alpha$  subunit, but also participate in several cellular processes such as adhesion, transcriptional gene regulation, cytoskeleton remodeling, and even apoptosis.

We have previously demonstrated the overexpression of  $\text{Na}_v$ 1.6 channel in cervical cancer (CeCa) biopsies and primary cultures, and its contribution to cell migration and invasiveness. Here, we investigated the expression of  $\text{Na}_v\beta$ s in the CeCa cell lines HeLa, SiHa and CaSki; and studied their contribution to cell proliferation, migration and invasiveness through *in vitro* assays, both under basal conditions and by increasing (with cDNAs) or decreasing (with siRNAs) the expression of  $\text{Na}_v\beta$ s.

We found that the four  $\text{Na}_v\beta$ s are expressed in the three CeCa cell lines analyzed, regardless of the lack of functional  $\text{Na}_v$   $\alpha$ -subunit expression in the plasma membrane. In addition, it was shown that manipulation of  $\text{Na}_v\beta$ s expression *per se* is not enough to promote the functional activity of  $\text{Na}_v$   $\alpha$ -subunits in the plasma membrane. Interestingly, overexpression of  $\text{Na}_v\beta$ 1 in SiHa cells increased cell proliferation, whereas its downregulation decreased cell duplication. Functional *in vitro* assays showed differential roles for  $\text{Na}_v\beta$ 1 and  $\text{Na}_v\beta$ 4, the latter as a cell invasiveness repressor and the former as a migration abolisher in CeCa cells. Finally, an *in-silico* analysis confirmed the negative regulation of  $\text{Na}_v\beta$ 4 expression in CaCu vs non-cancerous cervix, supporting our results on the participation of  $\text{Na}_v\beta$ 4 as a suppressor of cellular invasiveness.

Our results contribute to the recent conception about Nav $\beta$ s as multifunctional proteins involved in cell processes like ion channel regulation, cell adhesion and motility, and even in metastatic cell behaviors. These non-canonical functions of Nav $\beta$ s are independent of the presence of functional Nav  $\alpha$ -subunits in the plasma membrane and might represent a new therapeutic target for the treatment of cervical cancer.

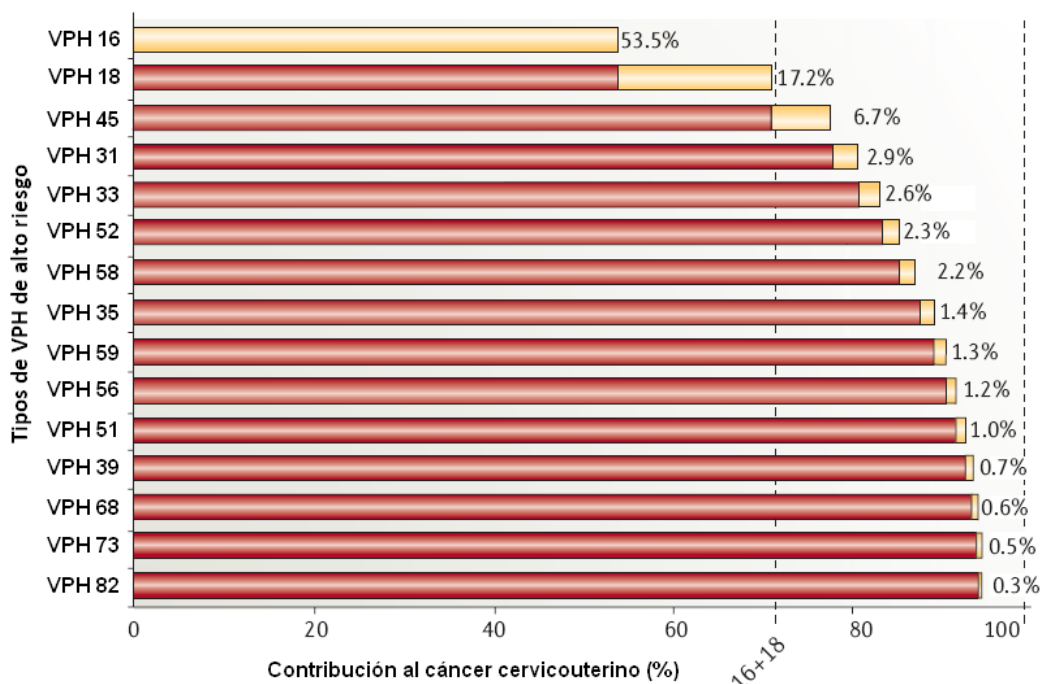
# INTRODUCCIÓN

## Cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino (CaCu) es un problema de salud prioritario debido a que es el cuarto tipo de cáncer más frecuente en mujeres a nivel mundial, con casi 570,000 nuevos casos cada año y aproximadamente 311,000 muertes en el mismo periodo, de las cuales el 87% ocurre en países en vías de desarrollo [1]. Hoy en día se sabe que la infección persistente con el virus de papiloma humano (VPH) juega un papel decisivo en el desarrollo del CaCu ya que es necesaria, aunque no suficiente, para la generación de este cáncer, pues el DNA viral se encuentra presente en más del 99% de los casos de CaCu [2, 3]. Los VPH son virus pequeños cuyo material genético está formado por DNA de doble cadena y que se clasifican de acuerdo con su genotipo. A la fecha se conocen más de 130 tipos diferentes, de los cuales aproximadamente 40 pueden infectar el tracto genital, siendo los tipos 16 y 18 los más frecuentes en el CaCu (denominados de alto riesgo), presentándose hasta en el 70% de los casos (**Fig. 1**) [4]. Lo anterior ha permitido conocer el papel del VPH en el desarrollo de lesiones premalignas y malignas del cuello uterino, lo cual ha tenido importantes implicaciones en la metodología de identificación, diagnóstico y tratamiento del CaCu. Sin embargo, aun con todos estos avances el CaCu es todavía un problema de salud apremiante en el mundo, y en especial en países en vías de desarrollo como el nuestro.

El CaCu surge como resultado de un proceso de cuatro pasos: transmisión del VPH, persistencia de la infección viral, progresión de una clona con infección persistente a precáncer, e invasión a través de la membrana basal del epitelio. La transmisión del VPH se produce principalmente por contacto piel con piel o mucosa con mucosa, siendo el contacto sexual la primera causa de infección. El VPH infecta a las células basales (en donde puede permanecer quiescente por años) pasando a través de micro abrasiones en el epitelio cervical y comienza a replicar su genoma dentro de la célula de forma episomal. Posteriormente, la expresión de las proteínas virales, así como el ensamblaje del virus ocurre principalmente en las capas más externas del epitelio. La progresión a cáncer invasivo está asociada a la integración del DNA viral al genoma del hospedero, y se calcula que en promedio hay en un

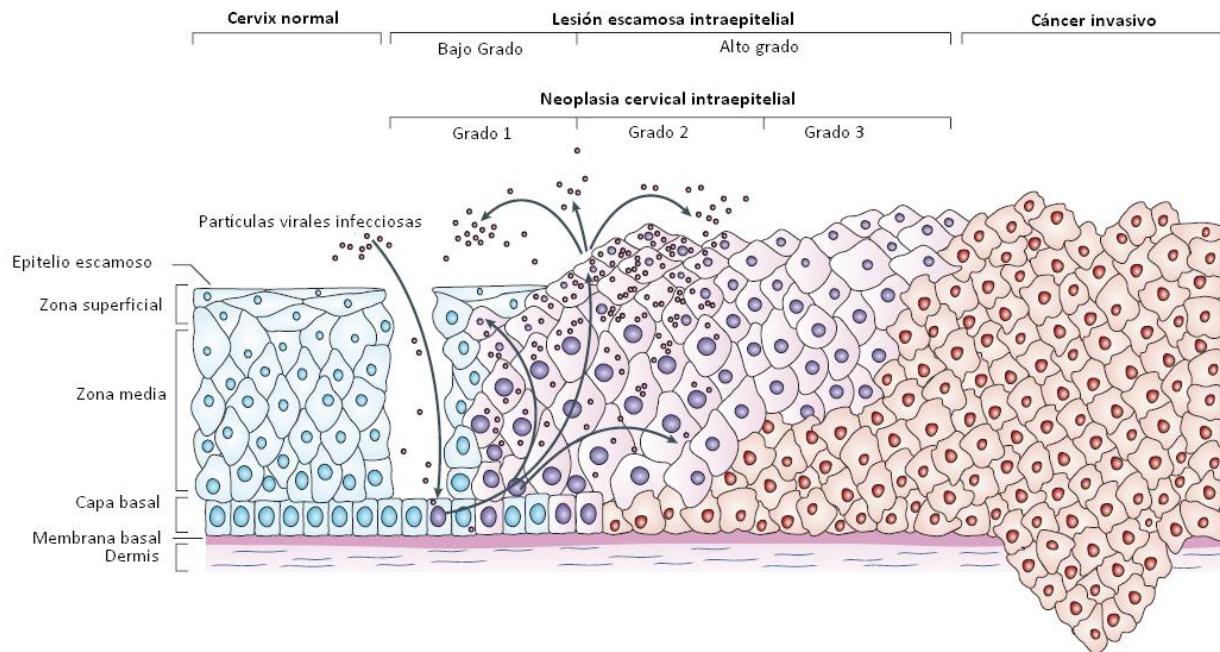
lapso de entre 10 y 20 años entre la infección inicial con el VPH oncogénico hasta el desarrollo del cáncer invasor (**Fig. 2**) [5, 6].



**Figura 1. Frecuencia acumulativa de genotipos de VPH presentes en CaCu.** Se muestran los principales tipos de VPH de alto riesgo asociados a la generación del CaCu (VPHs oncogénicos). Las barras amarillas y los valores indicados a la derecha de las mismas muestran el porcentaje de casos de CaCu atribuidos a cada genotipo de VPH, mientras que las barras rojas indican el porcentaje acumulativo de los casos de CaCu. El VPH-16 junto con el VPH-18 suman aproximadamente el 70% de los casos totales de CaCu. Modificada de [7].

El CaCu es caracterizado por una fase pre-maligna bien definida. La mayoría de las veces, la infección con los VPHs oncogénicos cursa de forma asintomática, y, aunque la gran mayoría de las mujeres cursarán por una infección con VPH en algún momento de la vida, en aproximadamente el 90% de los casos ésta es erradicada por el propio sistema inmune, y pocas veces se convierte en una infección persistente. Únicamente un pequeño porcentaje de las infecciones persistentes (10-12%) con algún VPH oncogénico de alto riesgo puede llevar al desarrollo del cáncer. Los oncogenes virales E6 y E7 de los VPHs de alto riesgo son los que se encuentran sobre expresados de forma consistente en el CaCu, y pueden alterar múltiples vías de señalización ampliamente relacionadas con el desarrollo del cáncer. La proteína E6 se une e

inactiva a los supresores de tumores p53 y a PDZ, mientras que a la par estimulan las vías de PI3K, Akt, Wnt y Notch. Por otro lado, la proteína E7 se une e inhibe a la proteína Rb, otra proteína supresora de tumores [8].



**Figura 2. Progresión del CaCu.** El VPH infecta las capas basales a través de micro lesiones en el epitelio cervical. Seguida de la infección, los genes de expresión temprana se expresan y el genoma viral se replica en forma episomal (núcleos morados). En la zona media y la zona superficial el genoma viral se replica de forma más abundante y se expresan las proteínas de expresión tardía que forman la cápside viral generando viriones que son liberados y que pueden infectar otras células. Algunas infecciones con VPH de alto riesgo progresan a una neoplasia cervical intraepitelial de alto grado. La progresión de estas lesiones a un cáncer invasivo está asociada con la integración del genoma viral dentro del cromosoma del hospedero (núcleos rojos). Modificada de [5].

Tanto el CaCu como las lesiones pre-malignas se clasifican según el aspecto que presentan las células. Los dos tipos más comunes de cánceres de cuello uterino son el carcinoma de células escamosas, que se produce principalmente de células del exocervix, y el adenocarcinoma, que se origina de células glandulares productoras de mucosidad del endocervix. La infección persistente con el VPH-16 se ha asociado a la generación de carcinoma de células escamosas, mientras que la infección persistente con el VPH-18 se ha asociado más a la aparición del adenocarcinoma [5, 9].

Es común que en el desarrollo del cáncer sucedan cambios importantes en la célula que llevan a la expresión génica diferencial con respecto al tejido normal del cual se originó, confiriéndole las características propias de la enfermedad. Dentro de la gran variedad de genes cuya expresión se encuentra alterada está la familia de los canales iónicos, que recientemente han sido objeto de estudio en diferentes tipos de carcinomas debido a que son sobre expresados de manera específica en el fenotipo canceroso, abarcando características esenciales del cáncer como el aumento en la proliferación celular, migración, invasividad, y evasión de la apoptosis, entre otras. En particular, la superfamilia de canales iónicos activados por voltaje se ha relacionado con diferentes aspectos de la biología de varios tipos de cáncer, como el cáncer de mama, próstata, ovario, pulmón y colon [10-13].

### **Canales iónicos activados por voltaje**

La superfamilia de los canales iónicos activados por voltaje (CIAV) está conformada por los canales que transportan de manera selectiva iones sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) o cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) en respuesta a cambios de voltaje en el potencial de membrana de las células mediante un proceso que no implica gasto de energía y que es favorecido por un gradiente de concentración. Se trata de una gran variedad de canales formados por proteínas integrales de membrana que comparten similitudes estructurales y funcionales. En términos muy generales, son complejos multiproteicos compuestos por una o varias subunidades principales denominadas  $\alpha$ , las cuales son las responsables de formar el poro de conducción a través del cual transitan los iones de un lado al otro de la membrana plasmática, y, en la mayoría de los casos, éstas se encuentran asociadas a una o más subunidades auxiliares o accesorias, encargadas de regular la actividad y/o localización de las subunidades  $\alpha$  [14].

Estos canales se expresan principalmente en células excitables, en las cuales participan en la generación y propagación de potenciales de acción [15]. Sin embargo, el flujo de iones a través de ellos también desencadena múltiples eventos tanto en células excitables como en las no excitables, que incluyen procesos celulares tales como la regulación del volumen celular, eventos de señalización intracelular, contracción muscular, proliferación celular, migración,

invasividad, liberación de hormonas y neurotransmisores, así como la regulación de la expresión génica, tanto en condiciones fisiológicas como en diversas patologías [11, 14].

En los últimos treinta años se han encontrado cada vez más evidencias de la expresión y/o función desregulada de los CIAV en varios tipos de cáncer en comparación con los tejidos sanos, contribuyendo en la adquisición de diversas características del cáncer tales como la proliferación ilimitada, evasión de la apoptosis, angiogénesis sostenida, la reprogramación metabólica, migración e invasividad [11, 12, 16].

### **Canales de sodio activados por voltaje**

Los canales de sodio activados por voltaje (canales  $Na_v$ ) son responsables de la generación y propagación del potencial de acción en las células excitables, tales como neuronas, células musculares y células neuroendócrinas. Estos canales se activan en respuesta a los cambios en el potencial de membrana, permitiendo el paso rápido y selectivo de iones  $Na^+$  al interior de la célula gracias al gradiente electroquímico de dicho ion entre el ambiente extracelular e intracelular.

Los canales  $Na_v$  están formados por una subunidad principal  $\alpha$  de aproximadamente 260 kDa (~2000 aminoácidos), a través de la cual son conducidos los iones  $Na^+$ , y una o más subunidades auxiliares  $\beta$  de menor tamaño (alrededor de 35 kDa; **Fig. 3**), encargadas de modular la actividad de la subunidad  $\alpha$  mediante diversos mecanismos [17, 18].

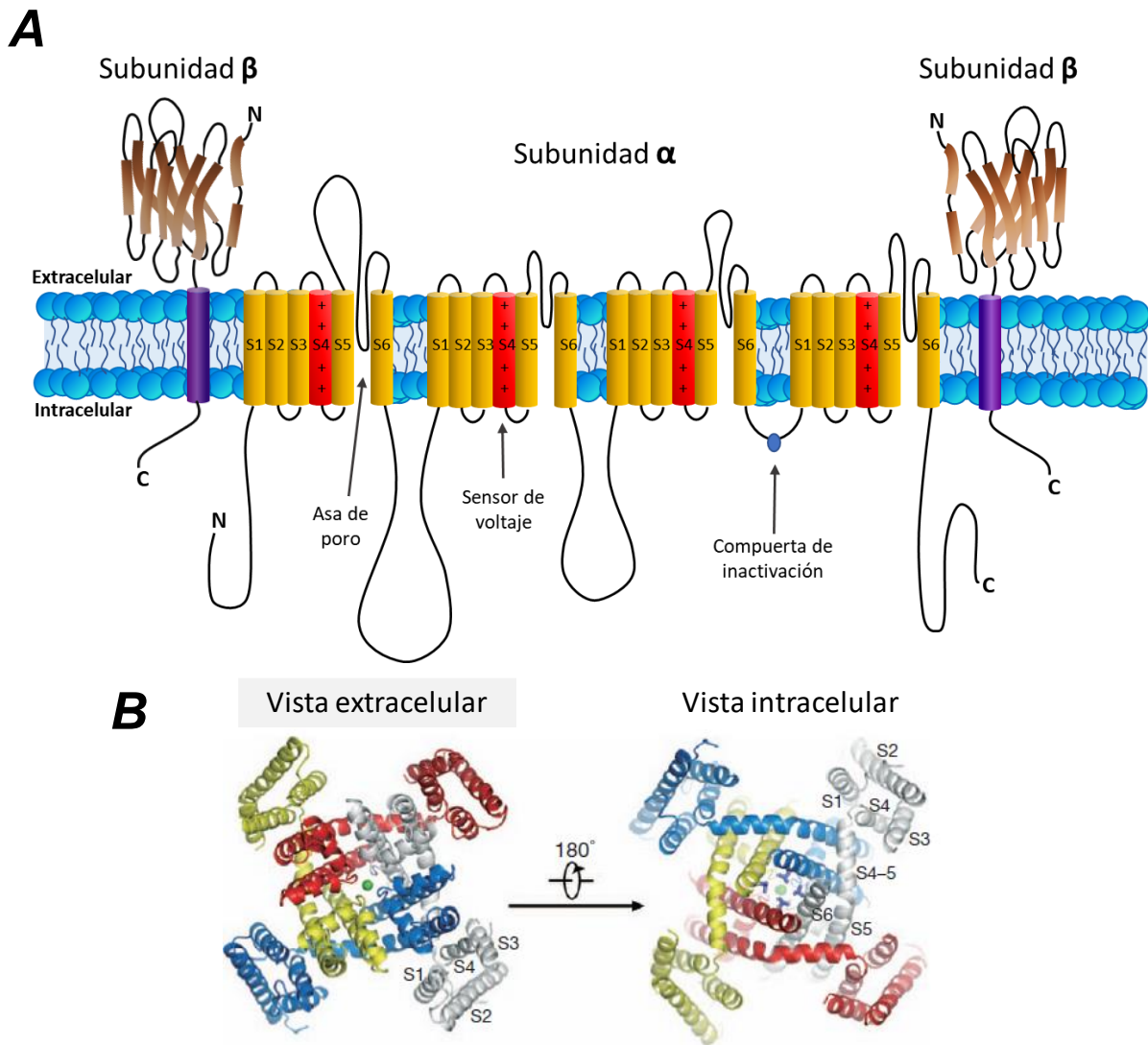
### **Subunidades $\alpha$ de los canales $Na_v$**

La subunidad principal  $\alpha$  de los canales  $Na_v$  está constituida por cuatro dominios homólogos (I-IV), cada uno de los cuales está formado a su vez por seis segmentos transmembranales con estructura de  $\alpha$ -hélice (S1-S6) conectados entre sí por asas intra y extracelulares. El segmento S4 de cada dominio contiene de 4 a 6 aminoácidos cargados de forma positiva (arginina o lisina) aproximadamente cada tres residuos, los cuales sirven como sensores de voltaje, desplazándose a través de la membrana celular para iniciar la activación (apertura) del canal en

respuesta a una despolarización de la membrana. Los segmentos S5 y S6 de cada dominio forman el poro de conducción del canal, mientras que las asas que unen a dichos segmentos, denominadas asas de poro, forman el vestíbulo externo del canal y el filtro de selectividad. Por otro lado, el asa intracelular que une al dominio III con el dominio IV funciona como compuerta de inactivación, plegándose dentro de la estructura del canal bloqueando el poro de conducción por la región intracelular durante una despolarización sostenida de la membrana (**Fig. 3A**) [18]. Hoy en día se cuenta con la estructura cristalográfica de varios canales Nav bacterianos [19-21], así como con el análisis de la estructura de varios canales Nav de humano a través de crio-microscopía electrónica [22, 23], con lo cual se ha podido corroborar la estructura tridimensional de las subunidades  $\alpha$  (**Fig. 3B**).

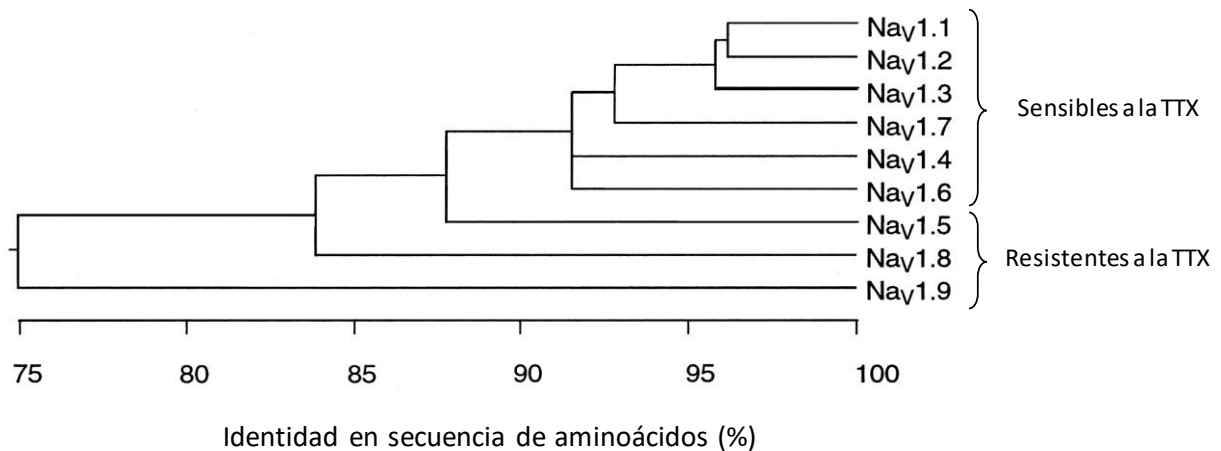
Hasta el momento se han clonado y caracterizado nueve isoformas diferentes de las subunidades  $\alpha$  de humano, todas ellas pertenecientes a la misma familia, y nombradas de Nav1.1 a Nav1.9. Dichas isoformas comparten más del 50% de identidad en la secuencia de aminoácidos en los segmentos transmembranales y los dominios extracelulares (**Fig. 4**), y pueden ser clasificadas de acuerdo con la sensibilidad que presentan al bloqueo por diferentes fármacos o toxinas, entre las que se encuentra la tetrodotoxina (TTX), toxina característica del pez globo. La TTX bloquea de forma selectiva a los canales Nav impidiendo el flujo de iones al obstruir el poro de conducción desde la parte extracelular. De esta manera existen dos grandes grupos de canales Nav: aquellos sensibles a la TTX, cuyas corrientes de sodio son abatidas con concentraciones en el orden nanomolar de la toxina (Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.6, y Nav1.7); y los resistentes a la TTX, en los cuales se requiere una concentración en el orden micromolar de la toxina para poder bloquear el flujo de sodio a través de ellos (Nav1.5, Nav1.8 y Nav1.9) [14, 24].





**Figura 3. Representación esquemática de los canales de sodio activados por voltaje.** (A) Se esquematiza la topología de la subunidad principal  $\alpha$ , la cual permite el paso de los iones a través de la membrana; y las subunidades  $\beta$ , que pueden estar acompañándola y regulándola. La subunidad  $\alpha$  está formada por 4 dominios homólogos (I-IV), cada uno de ellos formado por 6 segmentos transmembranales (S1-S6). El segmento S4 (marcado en rojo) funciona como sensor de voltaje, al tener residuos cargados de forma positiva. Las asas que unen a los segmentos 5 y 6 de cada dominio forman las denominadas asas de poro, mientras que el asa intracelular que une al dominio III con el dominio IV forma la compuerta de inactivación. (B) Estructura cristalográfica del canal  $\text{Na}_v\text{Rh}$  de la Alpha proteobacteria *Rickettsiales sp. HIMB114* formado por un tetrámero asimétrico, en donde cada uno de los cuatro dominios de la subunidad  $\alpha$  está representado con un color diferente. Al centro se observa el ion  $\text{Na}^+$  (esfera verde). Modificada de [21].

Las subunidades  $\alpha$  de los canales  $\text{Na}_v$  son suficientes para generar corrientes de sodio, sin embargo, éstas pueden ser reguladas por modificaciones postraduccionales (fosforilaciones y glicosilaciones), así como por las mismas subunidades  $\beta$ .



**Figura 4. Similitud en la secuencia de aminoácidos de las diferentes subunidades  $\alpha$  de los canales Nav.** Porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos de las diferentes subunidades  $\alpha$  de los canales Nav y clasificación dependiente de la sensibilidad al bloqueo por la TTX. Modificada de [25].

A diferencia de los canales de calcio y de potasio, los canales Nav tienen propiedades funcionales muy similares. Sin embargo, éstos se expresan de forma tejido-específica. De esta manera, los canales Nav<sub>v</sub>1.1, Nav<sub>v</sub>1.2, Nav<sub>v</sub>1.3 y Nav<sub>v</sub>1.6 se encuentran expresados principalmente el sistema nervioso central; Nav<sub>v</sub>1.7, Nav<sub>v</sub>1.8 y Nav<sub>v</sub>1.9 son característicos del sistema nervioso periférico; Nav<sub>v</sub>1.4 en músculo esquelético; y por último el canal Nav<sub>v</sub>1.5 se expresa principalmente en el corazón. Sin embargo, también se ha encontrado que estos canales se encuentran expresados en algunas células no excitables, en donde su papel fisiológico no ha sido completamente aclarado.

### Subunidades $\alpha$ de los canales Nav en cáncer

En los últimos treinta años, diversos estudios han documentado la sobreexpresión o expresión *de novo* de múltiples canales Nav en una gran variedad de tipos de cáncer, así como su contribución a diferentes mecanismos celulares relacionados con el fenotipo maligno, especialmente con la migración e invasividad celular. Adicional a ello, se ha encontrado que varios de estos canales son cáncer-específicos, lo cual sugiere a la posibilidad de utilizar estas proteínas como nuevos blancos terapéuticos, marcadores de detección temprana y/o marcadores pronósticos (**Tabla 1**).

Este nuevo campo de investigación se ha estudiado mayoritariamente en el cáncer de mama y el de próstata. En el primero se ha encontrado que las líneas celulares altamente metastásicas presentan corrientes de sodio activadas por voltaje, mientras que las células de bajo potencial metastásico no las presentan [26]. Además, al analizar la identidad molecular de los canales expresados en estas células se encontró que la subunidad Nav1.5 (específicamente la variante neonatal) es la que se encuentra sobre expresada en mayor abundancia. Al inhibir la actividad de estos canales, ya sea con TTX o bien abatiendo la expresión de dichos canales, la capacidad invasiva de las células disminuye significativamente [27, 28].

**Tabla 1. Expresión y participación de las subunidades  $\alpha$  en diferentes tipos de cáncer**

Cáncer	Canal Nav (subunidad $\alpha$ )	Característica metastásica involucrada	Referencias
<b>Mama</b>	Nav1.5, Nav1.7	Invasión, migración, endocitosis, adhesión, formación de invadopodia, proliferación.	[27-33]
<b>Próstata</b>	Nav1.2, Nav1.6, Nav1.7	Invasión, migración, endocitosis, adhesión, proliferación	[34-49]
<b>Cervicouterino</b>	Nav1.4, Nav1.6	Invasión	[50-53]
<b>Ovario</b>	Nav1.1, Nav1.5	Migración, Invasión	[54]
<b>Colon</b>	Nav1.5	Invasión	[55, 56]
<b>Pulmón células no pequeñas</b>	Nav1.5, Nav1.6, Nav1.7	Invasión	[57, 58]
<b>Pulmón células pequeñas</b>	Nav1.3, Nav1.5, Nav1.6	Endocitosis	[59, 60]
<b>Melanoma</b>	Nav1.6	Invasión, formación de podosomas	[61, 62]
<b>Leucemia</b>	Nav1.5, Nav1.6	Invasión, formación de podosomas	[62-65]
<b>Astrocitoma</b>	Nav1.5	Migración, invasión, proliferación, evasión de la apoptosis	[66]
<b>Neuroblastoma</b>	Nav1.5, Nav1.7	-	[67-69]
<b>Mesotelioma</b>	Nav1.2, Nav1.6, Nav1.7	Migración	[70]
<b>Gástrico</b>	Nav1.7	Invasión, proliferación	[71]

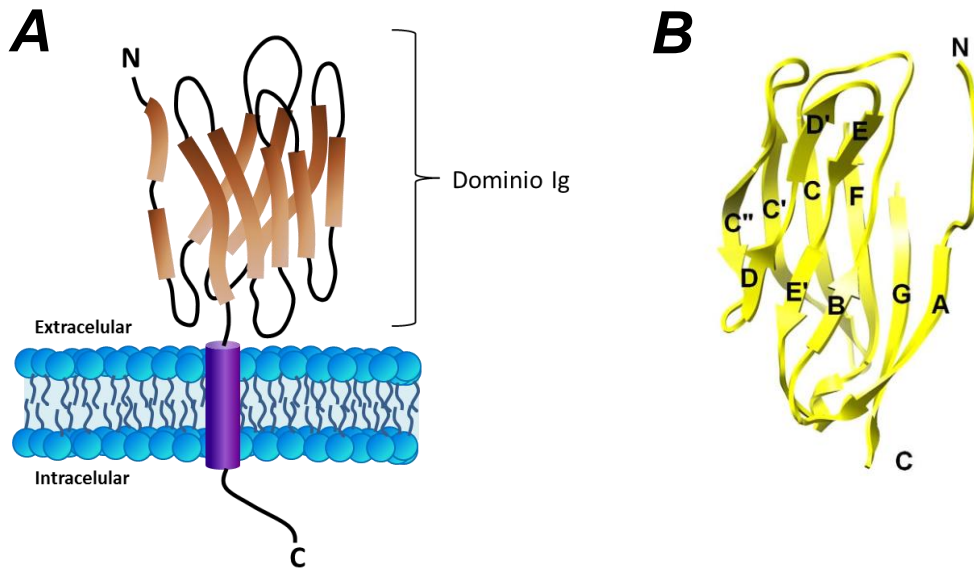
Por otro lado, en el cáncer de próstata el canal que más se encuentra sobre expresado en las líneas celulares de alto potencial metastásico es el  $\text{Nav}_V1.7$ , mismo que se encuentra en bajas cantidades o ausente en las líneas celulares de bajo potencial metastásico. Al igual que en el cáncer de mama, el bloqueo de los canales con TTX produce una disminución en la capacidad invasiva de las células [35, 36, 44]. Con el paso del tiempo, se han encontrado más evidencias de la participación de los canales  $\text{Nav}_V$  en otros tipos de cáncer, generalmente participando en la capacidad invasiva, aunque también han sido asociadas con otros mecanismos celulares tales como la migración, endocitosis, proliferación, actividad secretora, adhesividad, entre otras (ver **Tabla 1**).

### **Subunidades $\beta$ de los canales $\text{Nav}_V$**

Las subunidades  $\beta$  de los canales  $\text{Nav}_V$  ( $\text{Nav}_V\beta$ s) fueron identificadas originalmente como subunidades “auxiliares”, al demostrarse la interacción física que pueden tener con las subunidades  $\alpha$  y el papel que desempeñan como moduladoras de la apertura y cierre del canal, de las propiedades cinéticas de las corrientes de sodio y la localización de la subunidad  $\alpha$ . Se trata de proteínas que contienen un solo segmento transmembranal, un extremo carboxilo intracelular corto y un prominente dominio extracelular (extremo amino) cuya estructura es similar al de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Dominio Ig), dentro de las cuales se encuentran las moléculas de adhesión celular (CAMs) tales como la contactina [72] (**Fig. 5**).

A la fecha se han identificado cuatro subunidades  $\beta$ :  $\text{Nav}_V\beta1$ ,  $\text{Nav}_V\beta2$ ,  $\text{Nav}_V\beta3$  y  $\text{Nav}_V\beta4$ , así como una variante ( $\text{Nav}_V\beta1b$ ) que se genera por procesamiento alternativo del gen de  $\text{Nav}_V\beta1$  que carece de la región transmembranal [73-75]. Las subunidades  $\text{Nav}_V\beta1$  y  $\text{Nav}_V\beta3$  comparten una sustancial similitud en su secuencia de aminoácidos (alrededor de 45%) y ambas se asocian de forma no covalente a la subunidad  $\alpha$ . Por otro lado,  $\text{Nav}_V\beta2$  y  $\text{Nav}_V\beta4$  están relacionadas entre sí con aproximadamente un 35% de identidad, y se asocian de forma covalente con la subunidad  $\alpha$  formando puentes disulfuro a partir de cisteínas que se encuentran en la región extracelular [76]. Además, las  $\text{Nav}_V\beta$ s suelen estar altamente glicosiladas. El grado de glicosilación de estas

subunidades está relacionado con la expresión de éstas en la membrana celular y con las propiedades moduladoras de las subunidades  $\alpha$  [73, 77].



**Figura 5. Representación esquemática de las subunidades  $\beta$  de los canales  $Na_v$ .** (A) Se esquematiza la estructura general de las  $Na_v\beta_s$ , las cuales contienen un solo segmento transmembranal, un extremo carboxilo en la región intracelular y un prominente dominio extracelular similar al de las inmunoglobulinas (dominio Ig). (B) Estructura cristalográfica del dominio Ig de  $Na_v\beta_4$ . Las flechas representan a cada una de las láminas beta, nombradas de acuerdo con la convención estándar utilizada para las estructuras de las inmunoglobulinas [78].

La función clásica de las subunidades  $\beta$  consiste en modular las propiedades biofísicas de la subunidad  $\alpha$  de los canales  $Na_v$ , principalmente la dependencia al voltaje de la activación e inactivación, el curso temporal de la inactivación y la amplitud de la corriente [72]. Adicionalmente, se ha encontrado en sistemas heterólogos que también tienen la capacidad de interactuar con diferentes canales de potasio activados por voltaje, así como modular sus propiedades biofísicas [79].

Por otro lado, debido a la estructura de su dominio extracelular, las  $Na_v\beta_s$  pueden actuar como CAMs, interactuando tanto de forma *cis* como de forma *trans*, así como en forma homofílica o bien heterofílica. Por ejemplo, se sabe que  $Na_v\beta_1$  interactúa de forma *cis* con neurofascina-155, neurofascina-186, contactinas y cadherinas [80]. Adicional a ello,  $Na_v\beta_1$  y  $Na_v\beta_2$

interactúan con proteínas de la matriz extracelular tales como la tenascina-R [81]. Estas asociaciones ayudan a la correcta localización de las subunidades  $\alpha$ ; por ejemplo, en los nodos de Ranvier de las neuronas mielinizadas [72]. De igual manera, es bien sabido que las  $\text{Nav}\beta$ s están implicadas en el tráfico de las subunidades  $\alpha$  hacia la membrana, tal como se ha demostrado por expresión heteróloga *in vitro* en ovocitos de *Xenopus* [73, 82], e *in vivo* con ratones knockout para  $\text{Nav}\beta 2$  [83]. Las  $\text{Nav}\beta$ s también pueden interactuar de forma trans-homofílica de forma independiente de las subunidades  $\alpha$ , incrementando la adhesión celular, formando puntos de unión célula-célula en donde además reclutan a proteínas del citoesqueleto tales como las ankirinas a través del extremo carboxilo intracelular [84].

Otra función novedosa de las  $\text{Nav}\beta$ s es su papel en la regulación transcripcional. Se ha descrito que la subunidad  $\text{Nav}\beta 2$  sufre un corte por  $\gamma$ -secretasas generando dominios intracelulares solubles que se pueden translocar al núcleo celular [85], donde pueden inducir un aumento en la cantidad de mensajero del canal  $\text{Nav}1.1$  [86]. Esto abre la posibilidad de que la transcripción de otras proteínas también sea regulada por las  $\text{Nav}\beta$ s, y probablemente algunas de éstas se relacionen con la capacidad invasiva o de migración. Es evidente que aún queda mucho por conocer sobre las múltiples funciones de estas proteínas.

### **Subunidades $\beta$ de los canales $\text{Nav}$ en cáncer**

En los últimos años se ha reportado que las subunidades  $\beta$  de estos canales tienen un papel importante en la capacidad invasiva en líneas celulares de cáncer de próstata y de mama. En el primer caso, se encontró que las cuatro subunidades  $\beta$  se encuentran sobre expresadas (especialmente  $\text{Nav}\beta 1$ ) en líneas celulares de cáncer de próstata altamente metastásicas con respecto a aquellas con baja capacidad invasiva. Esto sugiere que  $\text{Nav}\beta 1$  interactúa con la subunidad  $\text{Nav}1.7$  (también sobre expresada en estas líneas celulares), incrementando su actividad y con ello potenciando la capacidad metastásica [87]. Por su parte, Jansson y colaboradores reportaron más recientemente que la sobreexpresión de la subunidad  $\text{Nav}\beta 2$  en la línea celular LNCaP de cáncer de próstata produce un aumento en la migración y en la

capacidad invasiva de estas células, al incrementar su longitud, pero a la vez disminuyendo el volumen de las mismas [88].

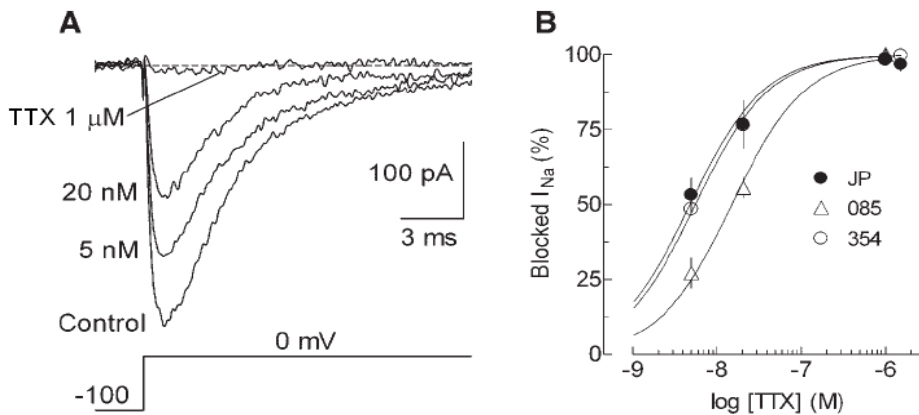
En lo que se refiere a la participación de las subunidades  $\beta$  en cáncer de mama, se ha visto que la subunidad  $\text{Nav}\beta 1$  se expresa alrededor de tres veces más en células MCF-7 con bajo potencial metastásico en comparación con la línea celular MDA-MB-231 altamente metastásica, tanto a nivel de mensajero como de proteína. El abatir la expresión de  $\text{Nav}\beta 1$  en las células MCF-7 tiene como consecuencia una disminución del 35% en la adhesión celular, así como un incremento del 121% en la capacidad de migrar de estas células *in vitro*. Por otro lado, la transfección estable de  $\text{Nav}\beta 1$  en células MDA-MB-231 fomenta una mayor adhesión celular y menor motilidad lateral y proliferación celular. En este caso se ha propuesto que  $\text{Nav}\beta 1$  funciona como molécula de adhesión, aumentando la agregación celular y disminuyendo así la capacidad de migración [89]. Sin embargo, la sobreexpresión de esta proteína en células endoteliales promueve un aumento en la secreción del factor de crecimiento vascular endotelial, lo que lleva a una mayor angiogénesis [90], mientras que en un modelo xenográfico en ratones, la sobreexpresión de la proteína promueve un aumento en el crecimiento de los tumores y la metástasis, y una reducción de la apoptosis en estas células [91]. Por medio de ensayos *in vitro* se encontró que la formación de las prolongaciones membranales que se observa en las células que sobre expresan  $\text{Nav}\beta 1$  en co-cultivo con fibroblastos se realiza vía adhesión *trans*-homofílica, y que este proceso requiere la presencia y actividad de la tirosina cinasa Fyn [91].

Por otro lado, la subunidad  $\text{Nav}\beta 3$  ha demostrado tener actividad pro-apoptótica cuando ésta es sobre expresada en células T98G (glioblastoma) y en células Saos2 (osteosarcoma), por una vía dependiente de p53. Haciendo un análisis genético, se encontró que el gen SCN3B (que codifica para  $\text{Nav}\beta 3$ ) contiene dos secuencias consenso de unión de p53 (elementos de respuesta a p53); una cercana a la región promotora y otra en el intrón 3, mismas que fueron comprobadas mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina [92].

Todas estas observaciones han hecho evidente la multifuncionalidad de las  $\text{Nav}\beta$ s, y la importancia que tienen en procesos tanto dependientes como independientes de las subunidades  $\alpha$ .

## ANTECEDENTES DIRECTOS

En el 2007, en nuestro laboratorio, se publicaron las primeras evidencias de la presencia y actividad de los canales  $Nav$  en cultivos primarios de CaCu positivos para el VPH-16 (el tipo viral más frecuente en este carcinoma) de pacientes mexicanas. Los tres cultivos primarios analizados presentaron corrientes de sodio activadas por voltaje, mismas que fueron inhibidas por completo con concentraciones de  $1 \mu\text{M}$  de TTX, indicando que los canales  $Nav$  responsables de estas corrientes pertenecen al grupo sensible a la TTX (**Fig. 6**). Adicional a ello, la presencia de los mRNAs de los canales  $Nav$  sensibles a la TTX se identificó por medio de RT-PCR [52].



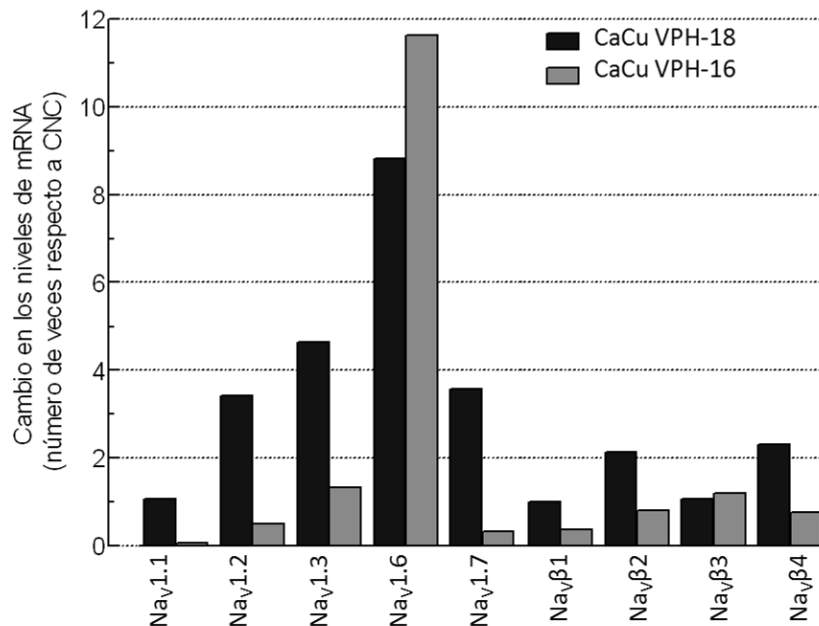
**Figura 6. Bloqueo con TTX de la corriente de sodio activada por voltaje de cultivos primarios de CaCu.**

**A:** Trazos representativos de corrientes de sodio a 0 mV en presencia de las concentraciones indicadas de TTX en una célula del cultivo primario 085. Se observa que a una concentración de  $1 \mu\text{M}$  de la toxina se inhibe por completo la corriente de sodio. **B:** Curva dosis-respuesta para el bloqueo de la corriente de sodio en función de la concentración de TTX en los tres cultivos primarios de CaCu, en donde se puede observar que en todos los casos la  $IC_{50}$  de la toxina se encuentra en el orden nanomolar [52].

Mediante un análisis de expresión génica con la técnica de PCR en tiempo real (qPCR) se encontró que existe una sobreexpresión de los canales  $Nav$  en los casos de CaCu (tanto en biopsias positivas a VPH-16 como en los cultivos primarios antes mencionados) respecto a los controles de tejido no canceroso; particularmente de la subunidad  $Nav1.6$ , lo cual permitió proponerla como un marcador molecular del CaCu [50]. Posteriormente, en mi trabajo de tesis de licenciatura extendí estos estudios a biopsias de CaCu positivas al VPH tipo 18. Mis resultados muestran que también existe una sobreexpresión del mensajero del canal  $Nav1.6$



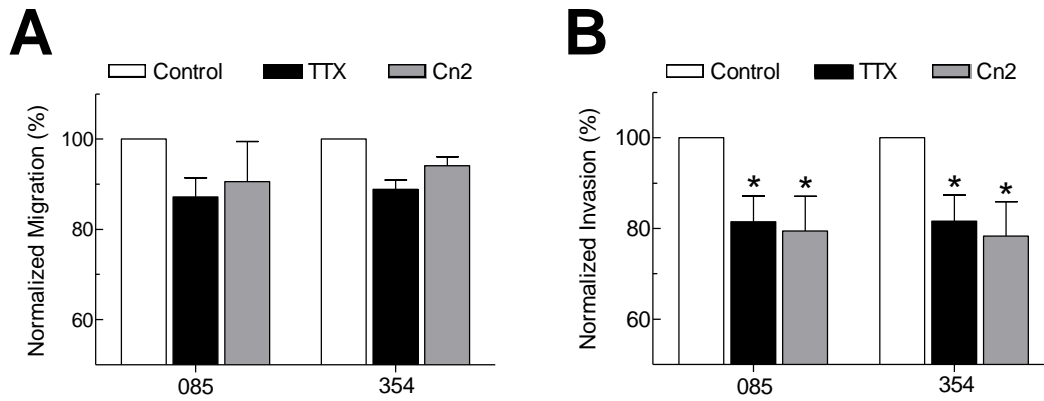
en estas biopsias en comparación con los controles de cérvix no canceroso [93] (**Fig. 7**). Resultados más recientes de nuestro grupo de investigación demuestran que el canal Nav1.6 también se encuentra sobre expresado en biopsias de CaCu positivas a otros VPHs oncogénicos, entre los cuales se encuentran los tipos 31, 45, 51, 52, 58, 59 y 68 [51]. Lo anterior indica que el canal Nav1.6 representan un potencial marcador molecular para la detección del CaCu.



**Figura 7. Cambios en los niveles de mRNA de los canales Nav en CaCu generado por VPH-16 y 18.** Se muestra el cambio en los niveles de mRNA de los canales Nav en biopsias de CaCu generado por VPH-18 (barras negras) y VPH-16 (barras grises) con respecto a los controles de cérvix no canceroso (CNC). La subunidad más sobre expresada en ambos casos es Nav1.6 [93].

Por otra parte, mediante ensayos *in vitro* y utilizando bloqueadores de la actividad de los canales Nav en general (con la toxina TTX) o de manera selectiva el canal Nav1.6 (con la toxina Cn2), se analizó la participación de los canales Nav en la capacidad de migración e invasividad de los cultivos primarios 085 y 354 de CaCu. Los resultados mostraron una disminución tanto en la migración como en la capacidad invasiva de los cultivos primarios (aunque el efecto solo fue significativo en el caso de la invasividad) al bloquear a los canales Nav con cualquiera de las dos toxinas, lo cual sugiere que la actividad de los canales Nav1.6 favorece la capacidad

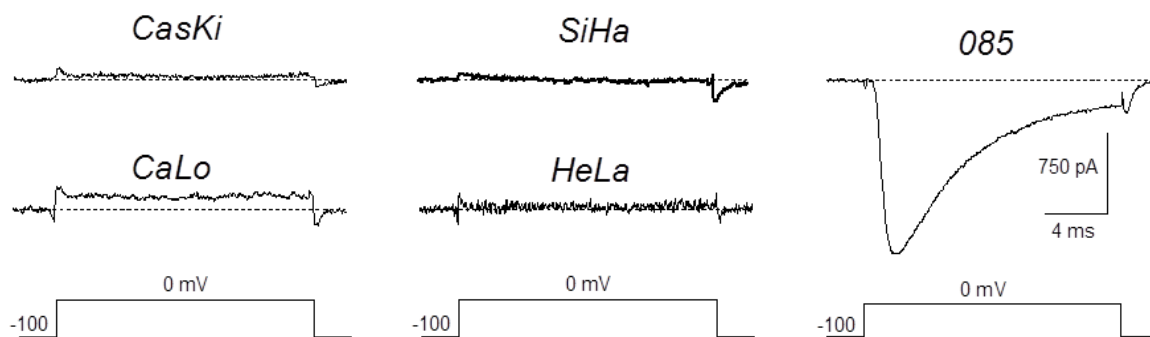
metastásica de dichas células [50] (**Fig. 8**), mientras que la sobrevivencia y proliferación de estas células no se ve afectada por la presencia de las toxinas.



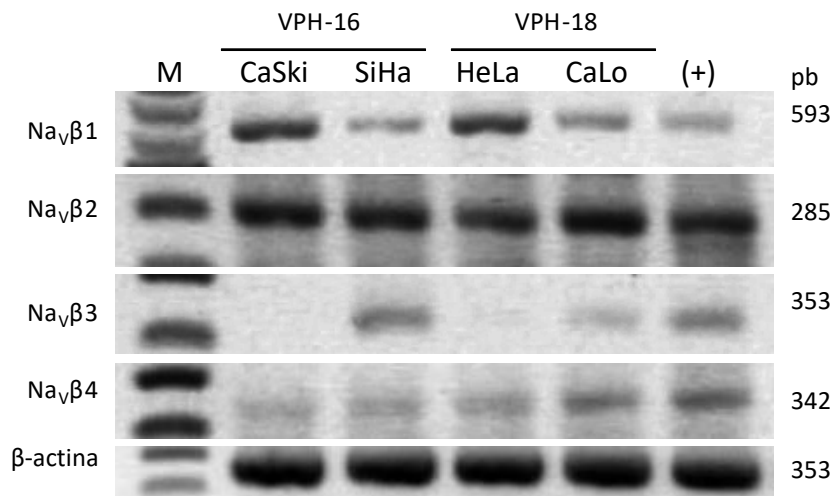
**Figura 8. Contribución de los canales  $Na_v$  en la invasividad *in vitro* de cultivos primarios de CaCu.** Migración (A) e invasividad (B) de los cultivos primarios 085 y 354 de CaCu en presencia de 6  $\mu$ M de TTX o 1  $\mu$ M de Cn2. Los datos fueron normalizados con respecto al control sin toxina y se presentan en forma de porcentaje. Diferencias significativas con respecto al control; \* $p < 0.001$  [50].

Más recientemente, en mi trabajo de maestría, analicé la expresión de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los canales  $Na_v$  en 4 líneas celulares de CaCu: SiHa, CaSki, HeLa y CaLo; las primeras dos positivas para VPH-16, mientras que las dos últimas fueron generadas por la infección con VPH-18. Contrario a lo esperado, considerando los resultados descritos en los párrafos anteriores, las líneas celulares analizadas no expresaron las subunidades  $\alpha$  de los canales  $Na_v$  a nivel de mensajero (analizado por PCR convencional), ni tampoco a nivel funcional, ya que en ninguna línea celular fue posible detectar corrientes de sodio activadas por voltaje exploradas por medio de la técnica de *patch-clamp* (**Fig. 9**). No obstante, sí se detectaron niveles apreciables del mensajero de las subunidades  $\beta$  de los canales  $Na_v$  en las líneas celulares mencionadas (**Fig. 10**), lo cual sugiere que podrían estar desempeñando una función independiente de las subunidades  $\alpha$  [94].

Con todos estos antecedentes, y debido a las evidencias que ya existen de la posible participación de las  $Na_v\beta$ s en el cáncer de mama y de próstata, nosotros nos preguntamos si estas proteínas podrían estar participando en alguno de los procesos relacionados con el fenotipo canceroso del cáncer cervicouterino.



**Figura 9. Trazos representativos de corrientes registradas en líneas celulares de CaCu.** Ejemplos de registros de corriente en las líneas celulares CaSki, SiHa, CaLo y HeLa, así como en el cultivo primario 085 de CaCu. Las corrientes fueron evocadas por pulsos despolarizantes a 0 mV de 16 ms de duración a partir de un potencial de mantenimiento de -100 mV. Ninguna de las líneas celulares presentó corrientes de sodio activadas por voltaje. De acuerdo con lo ya reportado anteriormente el cultivo primario 085 presentó corrientes de sodio robustas [52, 94].



**Figura 10. Expresión del mRNA de las subunidades β de los canales Nav en las líneas celulares de CaCu.** Resultados de las reacciones de RT-PCR estándar en las líneas celulares CaSki y SiHa (positivas para VPH-16), y en HeLa y CaLo (positivas para VPH-18) en las cuales se utilizaron *primers* específicos para cada una de las subunidades β señaladas a la izquierda de cada panel. Control positivo: cultivo primario 354. M: marcador de peso molecular, pb: pares de bases [94].

## **OBJETIVO GENERAL**

Investigar la participación de las subunidades  $\beta$  de los canales de sodio activados por voltaje en el fenotipo cancerígeno de líneas celulares de cáncer cervicouterino positivas a VPH-16 y VPH-18.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Caracterizar la participación de las subunidades  $\beta$  de los canales  $\text{Na}_v$  en el fenotipo cancerígeno, es decir, en la proliferación, migración e invasividad, de las células CaSki y SiHa (VPH-16), así como en células HeLa (VPH-18).
2. Investigar el posible efecto de la modificación de la expresión de las subunidades  $\beta$  en la expresión de canales  $\text{Na}_v$  (subunidades  $\alpha$ ) funcionales en la membrana plasmática.
3. Estudiar la relación entre los niveles de expresión de la proteína de las subunidades  $\beta$  y el comportamiento metastásico de las líneas celulares de CaCu: proliferación, migración e invasividad.

## **HIPÓTESIS**

Las subunidades  $\beta$  de los canales  $\text{Na}_v$  contribuyen al fenotipo cancerígeno (proliferación, migración e invasividad) de las líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa, SiHa y CaSki.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivos celulares

Las líneas celulares de cáncer cervicouterino (**Tabla 2**) fueron crecidas y mantenidas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; GIBCO-Invitrogen Grand Island, NY, EUA) suplementado con 1 mM piruvato de sodio, 25 mM HEPES, 10% suero fetal bovino (SFB), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina, y fueron incubadas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Los cultivos fueron renovados dos veces por semana.

**Tabla 2. Información general de las líneas celulares de CaCu empleadas.**

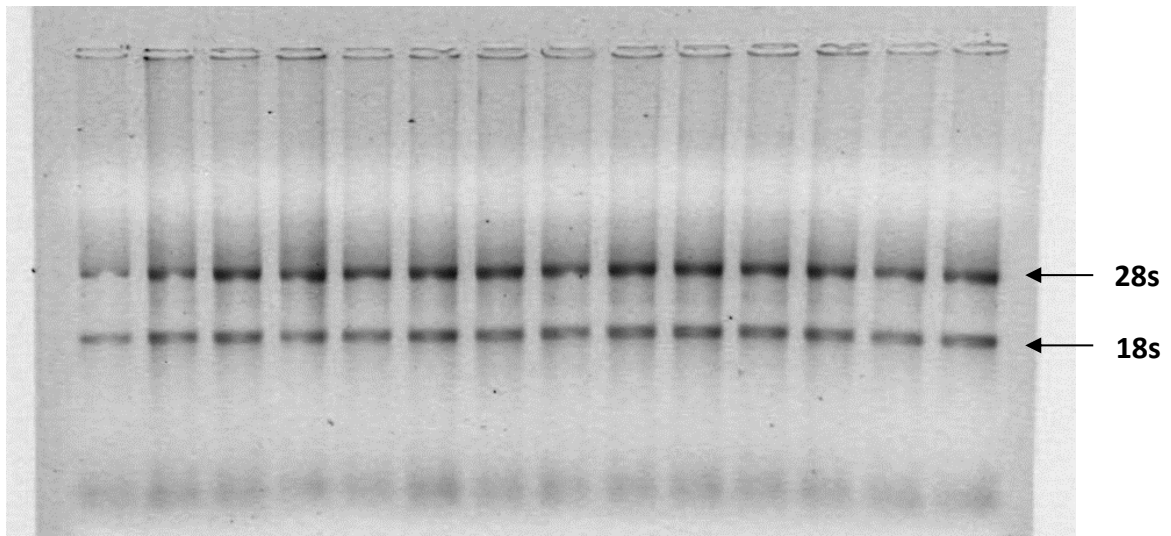
	HeLa	SiHa	CaSki
<b>Padecimiento</b>	Adenocarcinoma	Carcinoma de células escamosas	Carcinoma de células escamosas
<b>Tumor primario</b>	Cérvix	Cérvix	Cérvix
<b>Tumor metastásico</b>	--	--	Intestino delgado
<b>Tipo de VPH</b>	VPH-18	VPH-16	VPH-16
<b>Edad de la paciente</b>	31 años	55 años	40 años
<b>Etnicidad</b>	Negra	Asiática	Caucásica

La información mostrada se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC).

Las tres líneas celulares fueron autenticadas por análisis de STRs (microsatélites) en la unidad de Medicina Genómica del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga" previo a la realización de los experimentos.

### Extracción del RNA

La extracción del RNA total de las líneas celulares se realizó con el reactivo de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). En todos los casos, la concentración de los RNAs fue determinada con ayuda de un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), y su integridad fue evaluada por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Todas las muestras se almacenaron a -80 °C para su uso posterior.



**Figura 11. Separación electroforética del RNA total extraído de las líneas celulares de CaCu.** Se muestra una imagen representativa de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio; en cada carril se depositaron de 200 a 500 ng de RNA total de células HeLa, SiHa y CaSki bajo diferentes tratamientos. Nótese la integridad de las dos fracciones de RNA ribosomal esperadas (28s y 18s).

### RT-PCR

La presencia del mRNA de cada una de las Nav $\beta$ s se analizó primero por medio de RT-PCR utilizando *primers* específicos para cada subunidad, y  $\beta$ -actina como control (**Tabla 2**). Las reacciones se realizaron utilizando el kit *Super-Script One-Step RT-PCR* (Invitrogen) en un termociclador programable de 96 pozos Veriti (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) en un volumen final de 25  $\mu$ l, conteniendo 250 ng de RNA total, 0.5  $\mu$ l de la mezcla de enzimas RT/*Platinum Taq*, 0.2-0.5  $\mu$ M de cada *primer* y 12.5  $\mu$ l de la mezcla de reacción 2X, que a su vez contiene 0.4 mM de dNTP y 2.4 mM de MgSO<sub>4</sub>.

El ciclado térmico consistió en una primera etapa de 30 min a 50°C en la cual se realiza la síntesis del DNA complementario (cDNA), seguida de la desnaturalización a 94°C durante 2 min, y 40 ciclos de reacción, cada uno con los siguientes pasos: 15 s a 94°C, 30 s a la temperatura óptima de hibridación (**Tabla 3**), y 30 s a 72°C en donde se realiza la elongación. Al finalizar los 40 ciclos, se sometió a las muestras a una etapa final de elongación a 72°C durante 7 min. Finalmente, la identidad de los productos de PCR obtenidos se comprobó mediante la visualizaron en geles de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio.

**Tabla 3. *Primers* empleados en las reacciones de RT-PCR**

mRNA	No. acceso en el <i>GenBank</i>	Especie	Secuencia de los <i>primers</i> (5' → 3')	Tamaño del amplificado (pb)	Temp. de hibridación
Navβ1	NM_001037	Humano	F: AGAAGGGCACTGAGGAGTTT R: GCAGCGATCTTCTTGTAGCA	379	60°C
	BC094523.1	Rata	F: GAGACCGAGGCCGTGTATGGGATG R: GCCCAGGGCCAGGGCTATT	593	66°C
Navβ2	NM_004588	Humano	F: GCCCACCCGACTAACATCTC R: ATGCGGAACTGGAGGAACA	285	62°C
	NM_012877.1	Rata	F: CGGGGAACCCAGTAAGTACGACG R: GCCATCTTCCGCTTGCCTCG	335	68°C
Navβ3	NM_018400	Humano	F: CTGGCTTCTCTCGTGCTTAT R: TCAAACCTCCCGGACACATT	353	60°C
Navβ4	NM_174934	Humano	F: CACGCCACCATCTTCTCTCAA R: TGCAGCTGCTCAGCCCGAAG	284	65°C
β-actina	NM_001101	Humano	F: GCTCGTCGTGACAACGGCTC R: CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC	353	60°C

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

### RT-PCR en tiempo real (qPCR)

Como primer paso se llevó a cabo la síntesis de cDNA a partir de 2 µg de RNA total de las muestras de interés y las muestras control, utilizando el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). La mezcla de reacción incluyó además 2 µl de amortiguador 10X, 0.8 µl de dNTPs a una concentración de 100 mM, 2 µl de *random primers* (oligonucleótidos de secuencia aleatoria que permiten la retrotranscripción de cualquier molécula de RNA presente en la muestra), y agua suficiente para obtener un volumen final de reacción de 20 µl. La síntesis del cDNA se realizó a 37°C por un periodo de dos horas, al término de lo cual se adicionaron 20 µl de H<sub>2</sub>O y se le denominó cDNA *stock*. Por último, a partir de dicho *stock* se hicieron diluciones 1:4 que fueron almacenadas en forma de alícuotas a -20 °C para su uso posterior.

Para llevar a cabo las reacciones de RT-PCR en tiempo real se usaron pares de *primers* y sondas fluorescentes de la tecnología “TaqMan” (Applied Biosystems) para cada uno de los genes de interés, tal como se ha reportado anteriormente [50]. Cada reacción se realizó por triplicado con un volumen final de 10 µl, conteniendo 3 µl de la dilución 1:4 de cDNA, 0.6 µl del ensayo (par de *primers* y sonda; **Tabla 4**), 3.9 µl de agua, y 7.5 µl del reactivo *TaqMan Universal PCR*

*Master Mix* (Applied Biosystems) que contiene los componentes necesarios a las concentraciones adecuadas para llevar a cabo la reacción. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Rotor-Gene® Q (Qiagen, Hilden, Alemania) y aplicando un ciclado térmico que consistió en lo siguiente: 2 min a 50°C, donde se genera la activación enzimática, 10 min a 95°C para desnaturalizar el cDNA, y 45 ciclos que a su vez consistieron en 15 s a 95°C y 1 min a 60°C para promover el alineamiento y la elongación. Una vez finalizada la reacción de qPCR, con la ayuda del programa Rotor-Gene® Q Software versión 2.1.0.9 se fijó un mismo umbral para todas las muestras en la fase geométrica de la reacción en la cual existe aproximadamente 100% de eficiencia, obteniendo los valores de  $C_T$  (ciclo de umbral) de cada una de las muestras en el umbral establecido, haciendo también un promedio del triplicado de cada muestra con su respectiva desviación estándar.

**Tabla 4. Características de los ensayos *TaqMan* empleados en las reacciones de qPCR.**

mRNA	No. acceso en el <i>GenBank</i>	Secuencia de los <i>primers</i> (5' → 3')	Tamaño del amplificado (pb)
Navβ1	NM_001037	F: GGAGGATGAGCGCTTCGA R: CAGATCCTGCAGGTCTTTGGT P: AATGGCAGCCGGGG	70
Navβ2	NM_004588	F: TGCAGCCGGAGGATGAG R: GAGGACCTGCAGATGGATCTTG P: CCCCTGACCGCCACCG	92
Navβ3	NM_018400	F: CGCCAGCCCCAGAAGAT R: CACAGGGAAGCAGACACTGA P: TTTCCCCTGGCTTCTC	90
Navβ4	NM_174934	F: AAGAAGTGGACAACACAGTGACA R: TGAGTTTCTTGATCAGCAGGATGAG P: CTGTCGTGGGCGGGGT	93

Se presenta la secuencia del *primer* sentido (F), del *primer* antisentido (R) y de la sonda (P) utilizados para cada gen estudiado. A la extrema derecha se muestra el tamaño del fragmento amplificado esperado y el porcentaje de eficiencia de la amplificación de cada mRNA.

El análisis de la abundancia relativa del mensajero de cada gen entre las distintas muestras se determinó mediante el método de  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  [95], utilizando como normalizador el valor de  $C_T$  obtenido en cada muestra para el gen HPRT1 (Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa 1; Applied Biosystems) y relativo a la expresión de Navβ1 en HeLa.



### **Sobreexpresión de las subunidades $\beta$**

Los plásmidos que contienen a las Nav $\beta$ s de rata fueron donados por la Dra. Lori Isom de la Universidad de Michigan (EUA). Éstos fueron caracterizados mediante digestiones con enzimas de restricción y por secuenciación automática del DNA. Cabe señalar que estas proteínas originarias de rata y sus análogas de humano tienen un alto grado de identidad entre ellas tanto a nivel de mensajero (entre el 83.7% y 90.3%), como a nivel de proteína (entre el 80.3% y el 98.1%). Adicionalmente, los anticuerpos dirigidos contra estas subunidades son capaces de reconocer por igual a la subunidad correspondiente originaria tanto de rata como de humano.

Los experimentos de transfección de las subunidades  $\beta$  de los canales Nav se llevaron a cabo utilizando el reactivo de JetPEI (Polyplus Transfection, Illkirch, Francia). Brevemente, las células se incubaron durante toda la noche (16 h) con una mezcla de transfección que incluyó 3  $\mu$ g del vector de expresión de la subunidad  $\beta$ , y 6  $\mu$ l del agente transfectante JetPEI en un volumen final de 200  $\mu$ l de 150 mM NaCl y 2 ml de medio completo. Al término de dicho periodo se retiró el medio de las cajas y se sustituyó por medio fresco. Después de 24, 48, 72 y 96 h de iniciada la transfección, se estudió el cambio en la expresión de las subunidades  $\beta$  a nivel de mensajero por RT-PCR y a nivel de proteína por western blot. Siguiendo el mismo procedimiento las células de CaCu fueron transfectadas para realizar ensayos de proliferación, migración e invasividad.

### **Abatimiento de la expresión de subunidades $\beta$ de canales Nav**

La expresión de las Nav $\beta$ s en las células de CaCu fue disminuida mediante el empleo de *siRNAs* prediseñados (**Tabla 5**) de 21 pares de bases que fueron introducidos a las células usando el reactivo N-TER™ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). La eficiencia de transfección con dichos *siRNAs* fue evaluada de forma cualitativa utilizando 50 nM del indicador de transfección *siGLO green* (Thermo Fisher Scientific) que consiste en oligonucleótidos dúplex marcados con un fluoróforo (6-FAM), el cual permite diferenciar por medio de microscopía de epifluorescencia aquellas células que han sido transfectadas. Después de 24 h de realizada la transfección, las células fueron lavadas 3 veces con PBS, se les colocó medio de cultivo fresco y finalmente

fueron observadas utilizando un microscopio de epifluorescencia Olympus IX71 (Center Valley, PA, EUA). Las microfotografías fueron adquiridas con una cámara Evolution VF Color Cooled (Media Cybernetics; Rockville, MD, EUA). Finalmente, la eficiencia de silenciamiento de los *siRNAs* fue evaluada por medio de qPCR y western blot, usando diferentes concentraciones de *siRNAs* y diferentes tiempos de incubación. Una vez establecidas las condiciones bajo las cuales se produjo un mayor abatimiento en la expresión, se realizaron los ensayos de proliferación, migración e invasividad correspondientes, que en todos los casos consistió en una concentración de 100 nM de los *siRNAs* correspondientes.

**Tabla 5. Secuencia de los *siRNAs* empleados para abatir la expresión de las Nav $\beta$ s**

mRNA blanco	Núm. de catálogo	Secuencia de los <i>siRNAs</i> (5' → 3')
Nav $\beta$ 1	SASI_Hs02_00308210	F: CCGAGGCCGUGUAUGGGAU[dT][dT] R: AUCCCAUACACGGCCUCGG[dT][dT]
Nav $\beta$ 2	SASI_Hs01_00083790	F: CAGUGAACCAACAAACAGUU[dT][dT] R: AACUGUUUGUGGUUCACUG[dT][dT]
Nav $\beta$ 3	SASI_Hs01_00206234	F: CCUGCAAUGUGUCCCGGA[dT][dT] R: UCCCGGACACAUUGCAGG[dT][dT]
Nav $\beta$ 4	SASI_Hs02_00368869	F: CCUCCAAGUCGUUGAUAGA[dT][dT] R: UCUAUAACGACUUGGAGG[dT][dT]

No. de identificación de cada *siRNA*; secuencias de los mismos (F: sentido; y R: antisentido); y mRNA blanco que reconocen.

### Western blot

El análisis de la expresión de las Nav $\beta$ s en células transfectadas con cada una de las subunidades  $\beta$ , o bien en condiciones control, fue evidenciado por medio de un análisis por western blot. Como primer paso se extrajo la proteína total de cultivos celulares, utilizando el buffer de extracción RIPA a pH 7.6 (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% detergente IGEPAL CA-630; Sigma-Aldrich, 1% deoxicolato de sodio, y 1% SDS) adicionando 0.4% de una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche; Basilea, Suiza) y sonicando la muestra con pulsos de 5 segundos e intervalos de reposo en hielo por al menos 1 min entre pulso y pulso hasta obtener una solución proteica completamente líquida (Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, EUA). La cuantificación de las proteínas obtenidas se realizó por el método de Bradford (Bio-

Rad, Hercules, CA, EUA) elaborando una curva estándar con concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA) y midiendo la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 595 nm en un biofotómetro Eppendorf AG 22331 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

Posteriormente, las proteínas (100 µg de cada muestra) fueron separadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10%, y transferidas en semi-seco a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF; Millipore, Billerica MA, EUA) mediante la aplicación de un campo eléctrico (electrotransferencia). El bloqueo se realizó con leche descremada al 5% en buffer TBS-Tween (100 mM TRIS, 150 mM NaCl y 0.1% Tween-20) durante dos horas en agitación a temperatura ambiente con la finalidad de bloquear todos los epítopos de la muestra y prevenir la unión inespecífica del anticuerpo. La detección de las Navβs se realizó incubando las membranas durante toda la noche en agitación constante a 4 °C con una dilución de los siguientes anticuerpos: conejo anti-Navβ1 (1:3000; LifeSpan BioSciences Inc., Seattle, WA, EUA); conejo anti-Navβ2 (1:1000; LifeSpan BioSciences Inc.); conejo anti-Navβ3 (1:5000; Abcam, Cambridge, RU); conejo anti-Navβ4 (1:3000; Novus Biologicals, Littleton, CO, EUA) y un anticuerpo casero ratón anti-β-actina (1:1000; donado amablemente por el Dr. José Manuel Hernández, del CINVESTAV) usado como control de carga. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con una dilución 1:10,000 de anticuerpo secundario anti-conejo o anti-ratón (según fuera el caso) acoplado a la peroxidasa de rábano (HRP; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, después de hacer tres lavados con TBS-Tween, el revelado se realizó mediante una reacción quimioluminiscente con la ayuda del reactivo SuperSignal West Pico (Thermo Fisher Scientific) durante 5 minutos y capturando las señales emitidas en películas radiográficas. Las intensidades de las señales obtenidas fueron calculadas con el software ImageJ (NIH; Bethesda, MD, EUA).

### **Registros electrofisiológicos**

Para investigar si la modificación en la expresión de las Navβs en células HeLa y SiHa induce la expresión funcional de canales Nav, las corrientes de sodio de las líneas celulares de CaCu fueron estudiadas con la técnica de *patch-clamp* en la configuración de célula completa [96].

Primero, las células fueron transfectadas con los plásmidos de expresión de cada una de las Nav $\beta$ s o bien con los *siRNAs* específicos para abatir su expresión. Posteriormente, a las 24, 48, 72 y 96 h de realizada la transfección, las células fueron tripsinizadas y sembradas en cubreobjetos de vidrio dentro de una placa de cultivo para poder ser transportadas y colocadas en la cámara de registro electrofisiológico para el análisis de la expresión de corrientes de sodio activadas por voltaje. Para ello se utilizó un amplificador de *patch-clamp* Axopatch 200B, el cual está conectado a una interfase Digidata 1320, y ésta a su vez a una computadora equipada con el software de pClamp 10.0 (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, EUA), con el cual se diseñaron y aplicaron los protocolos de voltaje necesarios para estudiar las corrientes de sodio. Las pipetas de registro (o electrodos de registro) se fabricaron a partir de capilares de vidrio con la ayuda de un estirador horizontal modelo P-97 (Sutter Instrument Co. Novato, CA, EUA), después las puntas de éstas fueron pulidas al calor con una microforja MF-830 (Narishigue Co. Japón). Para los registros se utilizaron pipetas con resistencias de 3-4 M $\Omega$ , después de haber sido llenadas con una solución interna de registro que contiene en mM: 112 CsCl, 30 NaCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 EGTA, 10 HEPES y un pH 7.3 ajustado con CsOH. La solución externa contenida en la cámara de registro contiene en mM: 158 NaCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES y un pH 7.4 ajustado con NaOH.

La realización de los registros electrofisiológicos implicó la obtención de un sello de alta resistencia  $\geq 1$  Giga ohmio (G $\Omega$ ) entre la membrana celular y la punta de la pipeta de registro, a un potencial de mantenimiento (HP) de 0 mV; acto seguido se impuso un HP de -100 mV, y se rompió el parche de membrana localizado en la punta del electrodo de registro, lo que permitió dos cosas: una, el intercambio casi instantáneo del contenido intracelular por el de la solución contenida en la pipeta de registro; y dos, fijar el HP intracelular a conveniencia del experimentador. Finalmente se cancelaron de manera analógica las espigas de corriente capacitiva asociadas a la instalación y corte de pulsos breves hiperpolarizantes de 5 mV. Una vez cubiertas estas etapas se procedió a registrar las corrientes de sodio activadas por voltaje aplicando pulsos despolarizantes a -10 mV durante 16 ms a partir de un potencial de mantenimiento a -100 mV. En algunas ocasiones también se aplicaron protocolos de voltaje denominados IV-16ms, los cuales exploraron la presencia de corrientes de sodio a potenciales

de membrana entre -60 y +80 mV. Como control positivo se utilizaron células HEK-Nav1.6 (células HEK-293 que expresan de manera estable el canal Nav1.6; donadas por GlaxoSmithKline R&D, Brentford, Reino Unido).

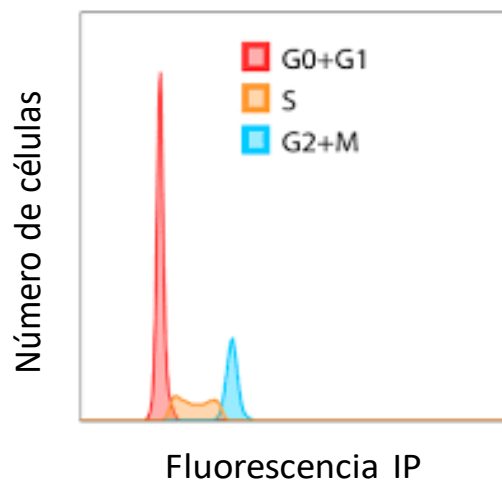
### **Ensayos de proliferación**

El análisis de la capacidad de proliferación de las líneas celulares de CaCu en condiciones basales, así como el efecto de la sobreexpresión o abatimiento de las subunidades  $\beta$  en la proliferación celular se realizó de la siguiente manera: en cada uno de los pozos de una placa de 48 pozos se sembraron 1000 células a partir de una misma suspensión celular. Después de 24 horas, las células fueron transfectadas con los vectores de expresión de cada una de las subunidades  $\beta$  para promover la sobreexpresión, o bien con los *siRNAs* específicos para abatir la expresión de dichas proteínas. Para cada condición por triplicado a las 24, 48, 72 y 96 horas después de realizada la transfección, se adicionaron 10  $\mu$ l de reactivo de MTT (Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico; Sigma-Aldrich) a una concentración de 5 mg/ml, y se incubó durante 3 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente se retiró el medio de cultivo del pozo para eliminar el exceso de MTT que no fue metabolizado, se añadió dimetilsulfóxido (DMSO) para disolver las sales de formazán generadas de forma intracelular por la captación y reducción del MTT, y se midió la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 562 nm en un biofotómetro Eppendorf AG 22331 (Eppendorf).

### **Análisis del ciclo celular por citometría de flujo**

La participación de la subunidad Nav $\beta$ 1 en el ciclo celular de las células SiHa fue analizada por medio de citometría de flujo después de teñir las células con ioduro de propidio (IP; Molecular Probes, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA). Brevemente, 2 x 10<sup>5</sup> células fueron sembradas en placas de 12 pozos, incubadas en condiciones normales por 24 h. Posteriormente fueron incubadas en condiciones de baja concentración de SFB (0.2%) por 48 h con la finalidad de sincronizar a las células en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo celular; después de lo cual las células fueron transfectadas con el respectivo cDNA o los *siRNAs* para sobre expresar o

inhibir la expresión de  $\text{Nav}\beta 1$  respectivamente. Una vez transfectadas, las células se incubaron en condiciones normales por 48 h y fueron colectadas y fijadas con etanol al 70% en frío y almacenadas por al menos 24 h a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , tratadas con RNasa y teñidas con IP por 1 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El IP se une estequiométricamente al DNA, con lo cual se puede determinar el contenido de DNA en una célula a través de la detección de la intensidad de fluorescencia de dicho compuesto en cada una de las células estudiadas. En un histograma de una población de células en diferentes etapas del ciclo celular, se observa un primer pico correspondiente a las células en G0/G1, y un segundo pico que corresponde a las células en la fase G2/M (con doble contenido de DNA). La banda entre ambos picos corresponde a la fase S (Fig. 12).



**Figura 12. Fundamento de la detección de las fases del ciclo celular por citometría de flujo con tinción con yoduro de propidio (IP).** Histograma en donde se muestra las diferentes poblaciones de células en cada fase del ciclo celular a partir de la detección de la fluorescencia del IP. El primer pico corresponde a las células que se encuentran en la fase G0/G1 (rojo), el segundo pico, con el doble contenido de DNA y por lo tanto con el doble de intensidad de fluorescencia, representa a las células que se encuentran en las fases G2/M (azul). Por último, la población de células que se encuentra entre ambos picos corresponde a aquellas que están en la fase S (anaranjado). Modificada de <https://cancer.wis.edu>.

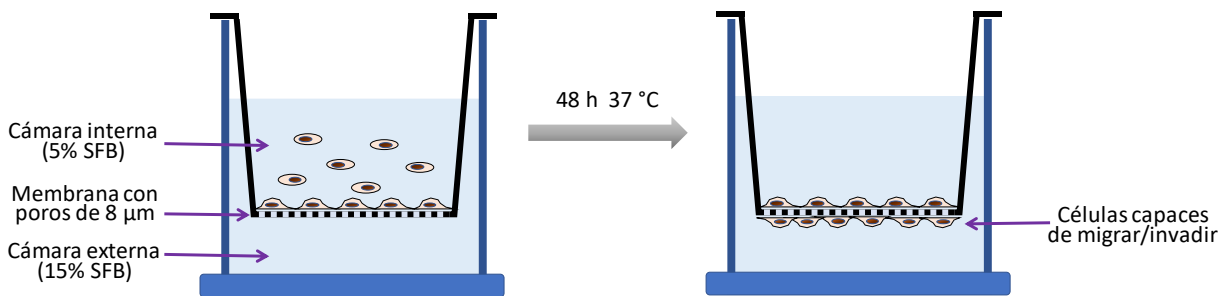
Para cada condición se analizaron  $2 \times 10^4$  células (singuletes). La mayoría de los experimentos se realizaron en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular con un citómetro de enfoque acústico Attune® (Applied Biosystems), mientras que algunos experimentos de estandarización se realizaron en el Laboratorio Nacional de Canalopatías del mismo instituto, con un citómetro Accuri C6 (BD Biosciences; San Jose, CA, EUA). En todos los

casos, los datos fueron analizados utilizando el software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, EUA), y finalmente, para determinar los porcentajes de células en cada una de las fases del ciclo celular se utilizó el algoritmo de Dean-Jett-Fox en cada uno de los tres experimentos diferentes para cada condición.

### **Ensayos de migración e invasividad**

Los ensayos de migración e invasividad se realizaron empleando el kit *Matrigel Invasion Chambers* (BD Biosciences). Este ensayo se basa en el principio de la cámara de Boyden, mismo que consta de dos cámaras (una dentro de la otra) separadas por una membrana de polietileno con poros de 8  $\mu\text{m}$  con (para invasividad) o sin recubrimiento de Matrigel™ (para migración). El Matrigel™ es un material que simula el ambiente extracelular al contener proteínas características de este ambiente como laminina y colágeno IV, al igual que diversos factores de crecimiento, como los factores de crecimiento epidermal y fibroblástico. En la cámara superior se coloca una cantidad conocida de células ( $5 \times 10^4$ ) en un medio pobre en SFB (5%), mientras que en la cámara inferior se agrega medio de cultivo con 15% de SFB que funciona como quimioatrayente (**Fig. 13**).

El Matrigel™ bloquea los poros de la membrana de polietileno impidiendo el paso de las células a través de ellos, sin embargo, las células capaces de invadir liberan enzimas proteolíticas que degradan el Matrigel™ y permiten la migración hacia el quimioatrayente en la cámara inferior. Las cajas multipozos fueron incubadas durante 48 h a 37°C en una incubadora de CO<sub>2</sub>. Después de la incubación, se removieron con algodón las células que no invadieron, se transfirió el inserto a un pozo limpio con 350  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo y 20  $\mu\text{l}$  de reactivo de MTT, realizando el ensayo descrito anteriormente para obtener una medida indirecta de la cantidad de células que fueron capaces de invadir o migrar según fuera el caso.



**Figura 13. Fundamento de los ensayos de migración e invasividad en cámaras de Boyden.** Se muestra el esquema de las cámaras de Boyden, las cuales consisten en una cámara interna que contiene a la suspensión celular en un medio de cultivo con bajo suero (5%), así como una cámara externa que contiene medio de cultivo enriquecido con 15% de SFB como quimioatrayente. Ambas cámaras están separadas por una membrana con poros de 8 µm de diámetro recubiertas (para el caso de la invasividad) o no (para la migración) con Matrigel. La cantidad de células que fueron capaces de migrar o invadir fueron medidas por medio del ensayo de MTT después de ser incubadas durante 48 h a 37 °C.

### Análisis de inmunohistoquímica in silico

La expresión de la subunidad  $Nav\beta4$  en biopsias de cáncer cervicouterino, al igual que en biopsias de cérvix no canceroso se analizó utilizando el Atlas de Proteínas Humanas (Human Protein Atlas; <http://www.proteinatlas.org/>), el cual se utiliza como una herramienta para el análisis de la expresión de diferentes proteínas en diversos tejidos humanos. Se trata de una base de datos de origen sueco que contiene un gran número de biopsias en condiciones normales o patológicas a las cuales se les ha hecho el análisis de expresión de diversas proteínas y mRNAs.

### Análisis y presentación de datos

Todos los resultados se muestran como los promedios de al menos tres experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar (DE). Las diferencias entre los valores obtenidos para cada ensayo funcional con respecto a la condición control fueron analizados por la prueba de *t* de Student de datos no apareados con una distribución de dos colas, y graficados con el programa GraphPad Prism versión 6.01 para Windows (La Jolla, CA, EUA).

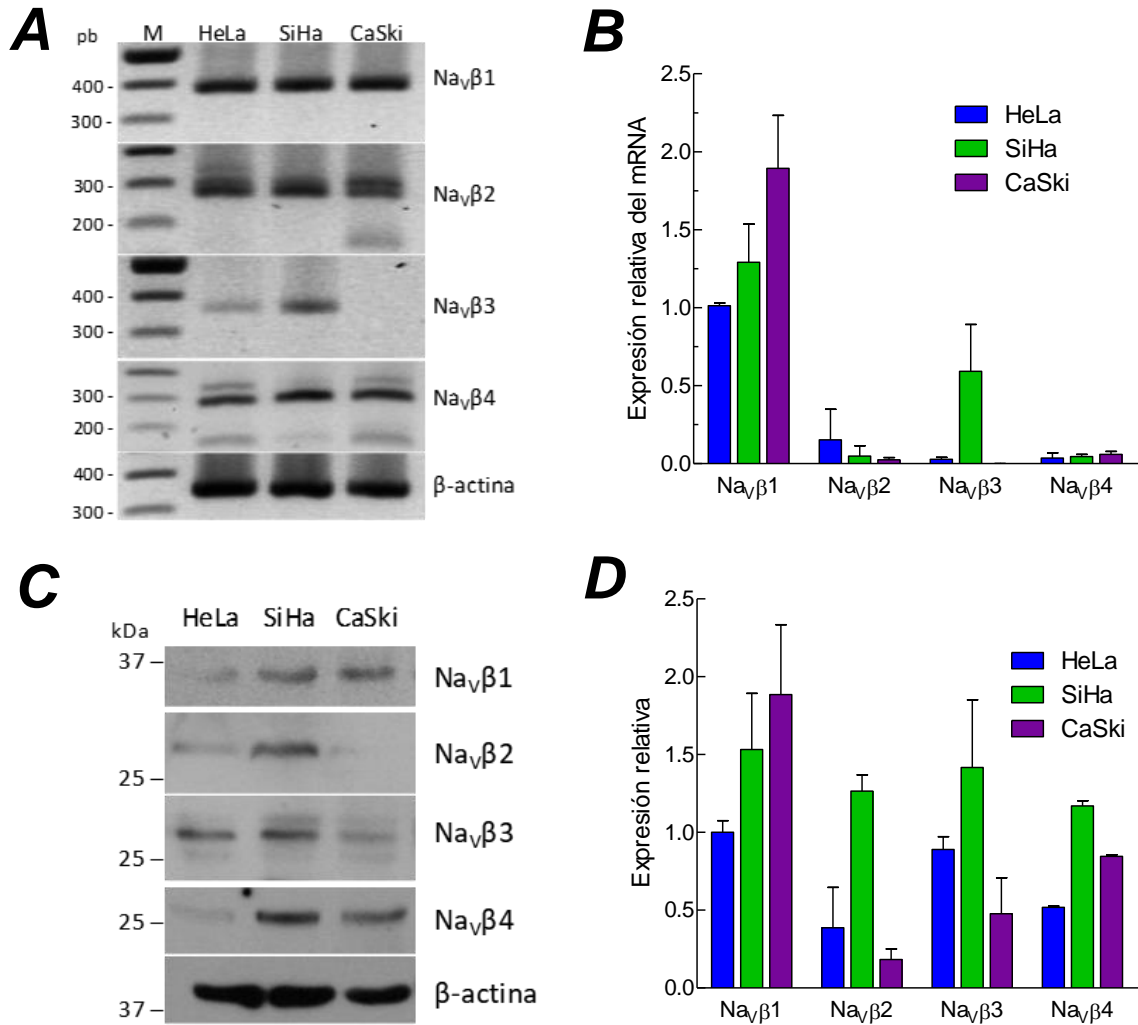


## RESULTADOS

### Expresión de las subunidades Nav $\beta$ en líneas celulares de CaCu.

El primer abordaje experimental para evaluar la expresión del mRNA de las Nav $\beta$ s fue mediante la técnica de RT-PCR convencional utilizando *primers* específicos para cada subunidad. En la mayoría de los casos, el mensajero se encontró de forma abundante en las tres líneas celulares, evidenciado por la generación de un amplificado de abundancia considerable, tal como se había demostrado previamente [94]. Posteriormente se realizó un análisis cuantitativo de la presencia del mRNA de cada subunidad por medio de qPCR, utilizando como normalizador al gen HPRT1, y comparando la expresión de cada una de las subunidades  $\beta$  con respecto a la expresión de Nav $\beta$ 1 en las células HeLa. De igual manera se analizó la expresión diferencial de las subunidades  $\beta$  a nivel de proteína en las tres líneas celulares de CaCu en condiciones basales por medio de la técnica de western blot y posterior inmunodetección con anticuerpos específicos para cada subunidad. Los resultados se muestran en la **Fig. 14**, en donde se puede observar que las tres líneas celulares expresan las Nav $\beta$ s, aun en ausencia de la expresión de corrientes de sodio activadas por voltaje, es decir, en ausencia de la expresión de las subunidades  $\alpha$  funcionales en la membrana plasmática, evidenciado por la técnica de *patch-clamp* en la configuración de célula completa [94].

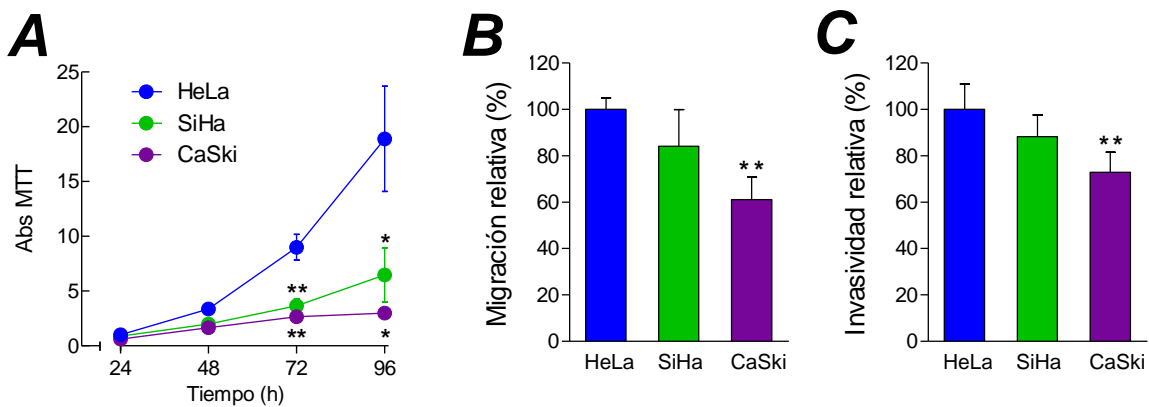
Cabe destacar que, si bien las tres líneas celulares de CaCu expresan las subunidades  $\beta$ , éstas se encuentran en bajas cantidades ya que para poder realizar la inmunodetección fue necesario un tiempo de revelado mayor a una hora, mientras que en el caso de  $\beta$ -actina únicamente de 2 a 5 minutos de exposición fueron suficientes para obtener las radiografías que se muestra en la **Fig. 14**. Aunado a ello, es evidente que existen diferencias en la expresión de estas proteínas en las células analizadas, siendo las células HeLa las que expresan una menor cantidad de Nav $\beta$ 1 y Nav $\beta$ 4, que como se mostrará más adelante, son las proteínas que están involucradas (de forma negativa) en las capacidades de migración e invasividad, respectivamente.



**Figura 14. Expresión relativa de las Nav $\beta$ s en las líneas celulares de CaCu.** (A) Resultados de RT-PCR para cada una de las Nav $\beta$ s indicadas del lado derecho, y para  $\beta$ -actina como control de carga. M: marcador de peso molecular. (B) Resultados de qPCR que muestran la expresión del mRNA de cada una de las Nav $\beta$ s normalizadas con respecto a la expresión del gen endógeno HPRT1 y relativo a la expresión del mensajero de Nav $\beta$ 1 en HeLa. Los resultados son el promedio de tres repeticiones  $\pm$  DE. (C) Western blot de cada una de las Nav $\beta$ s indicadas en células HeLa, SiHa y CaSki en condiciones basales. Como control de carga, se realizó la inmunodetección de  $\beta$ -actina. (D) Gráfico de los niveles de expresión de las Nav $\beta$ s normalizados respecto a la expresión de  $\beta$ -actina y relativos a la expresión de Nav $\beta$ 1 en HeLa. El análisis se realizó con el programa ImageJ y los resultados se muestran como el promedio de tres observaciones diferentes  $\pm$  DE.

## Capacidad de proliferación, migración e invasión de las líneas celulares de CaCu en condiciones basales

La proliferación de cada una de las líneas celulares se analizó por medio de ensayos de MTT a las 24, 48, 72 y 96 h después de haber sido sembradas. Como se puede observar en la **Fig. 15A**, las células HeLa proliferaron 3-4 veces más que sus contrapartes SiHa y CaSki durante los periodos de tiempo estudiados. Por otro lado, los ensayos de migración e invasividad *in vitro* en condiciones basales también muestran diferencias en las capacidades metastásicas de cada una de las líneas celulares estudiadas (**Fig. 15B y C**).



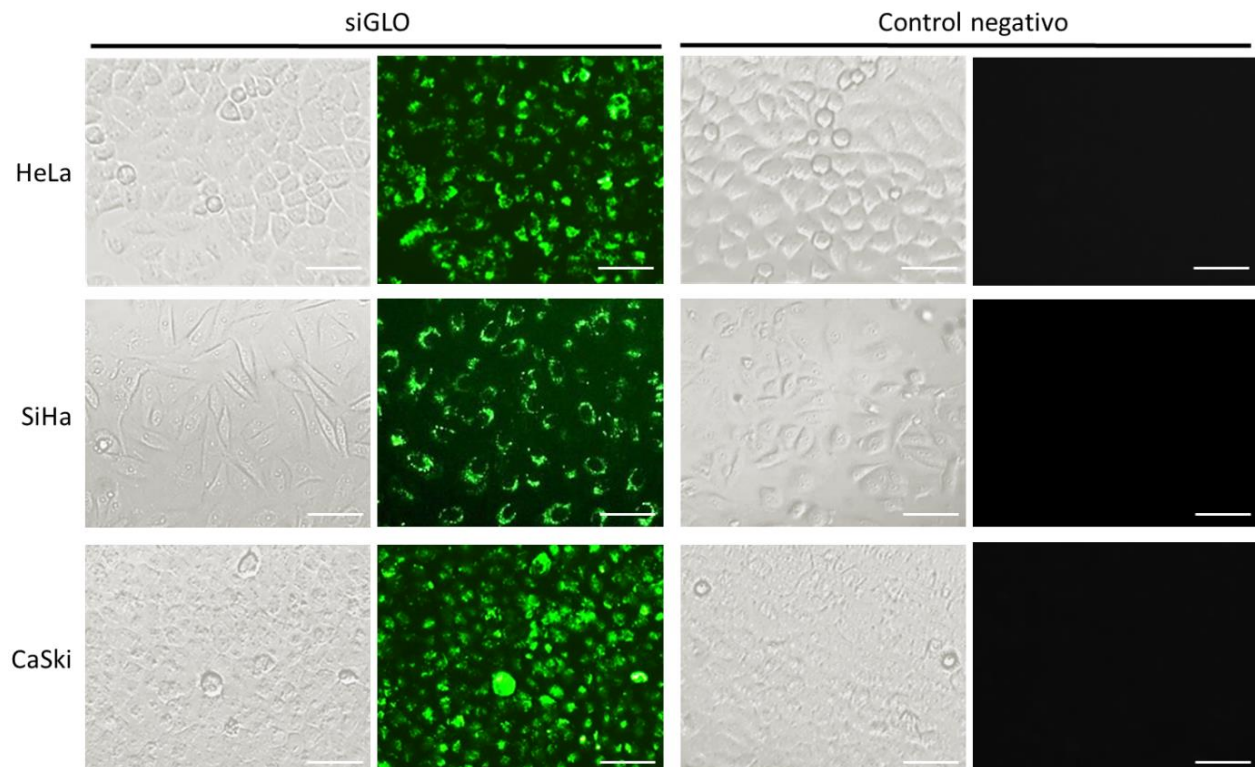
**Figura 15. Proliferación, migración e invasividad de células HeLa, SiHa y CaSki en condiciones basales.** Resultados de la proliferación (A), migración (B) e invasividad (C) de las líneas celulares de CaCu en condiciones basales. Los datos son promedios  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. Diferencias significativas con respecto a los resultados obtenidos en células HeLa; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

En conjunto, los resultados muestran que las células HeLa son las que tienen mayor capacidad de proliferar, migrar e invadir *in vitro*, seguidas por las células SiHa y finalmente las CaSki, que mostraron ser las menos invasivas y con una proliferación más lenta, colocando así a las células HeLa como aquellas con el fenotipo más agresivo, y por el contrario a las células CaSki como las menos agresivas.

## Eficiencia de transfección con *siRNAs*

La eficiencia de transfección con *siRNAs* en las células HeLa, SiHa y CaSki fue evaluada de forma cualitativa por microscopía de epifluorescencia utilizando el indicador de transfección *siGLO*

*green* que consiste en oligonucleótidos dúplex marcados con un fluoróforo (6-FAM). Las condiciones de transfección fueron las mismas que se utilizaron para abatir la expresión de las subunidades  $\beta$  con *siRNAs* específicos. Los resultados muestran que después de 24 h de realizada la transfección, la eficiencia del tratamiento con *siRNAs* es aproximadamente del 100% (**Fig. 16**). Los controles negativos corresponden a las mismas células tratadas con el reactivo transfectante pero en ausencia del indicador de transfección.

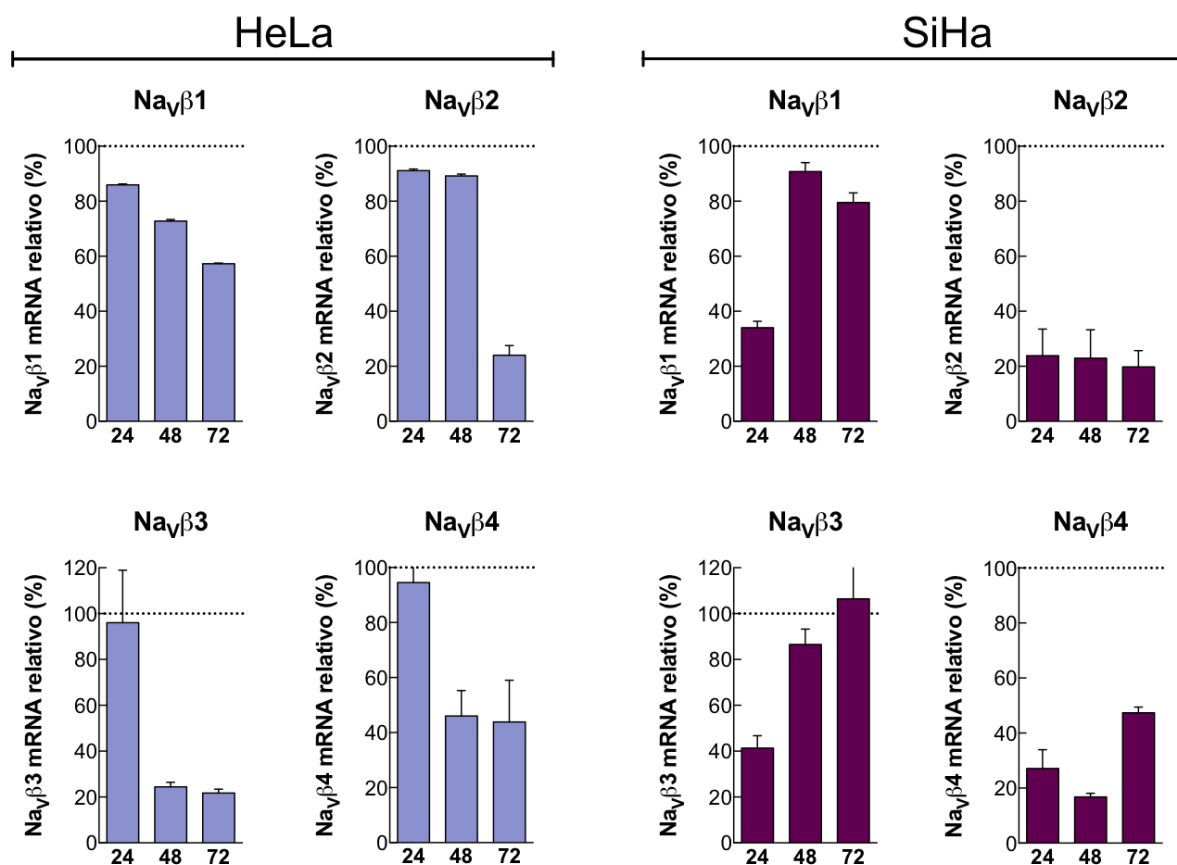


**Figura 16. Eficiencia de transfección con *siRNAs* en células HeLa, SiHa y CaSki.** Microfotografías que muestran la fluorescencia emitida por el indicador de transfección *siGLO green* y el correspondiente campo claro en células HeLa, SiHa y CaSki que fueron transfectadas con los oligonucleótidos marcados (*siGLO*) o bien que recibieron el mismo tratamiento, pero en ausencia del indicador (control negativo). Las imágenes fueron obtenidas a las 24 h de haber realizado el tratamiento correspondiente. En las tres líneas celulares la eficiencia de transfección es de aproximadamente el 100%. Barra de escala: 40  $\mu$ m.

### **Cambios en los niveles de expresión de las $Na_v\beta$ s después de inducir su aumento o abatimiento**

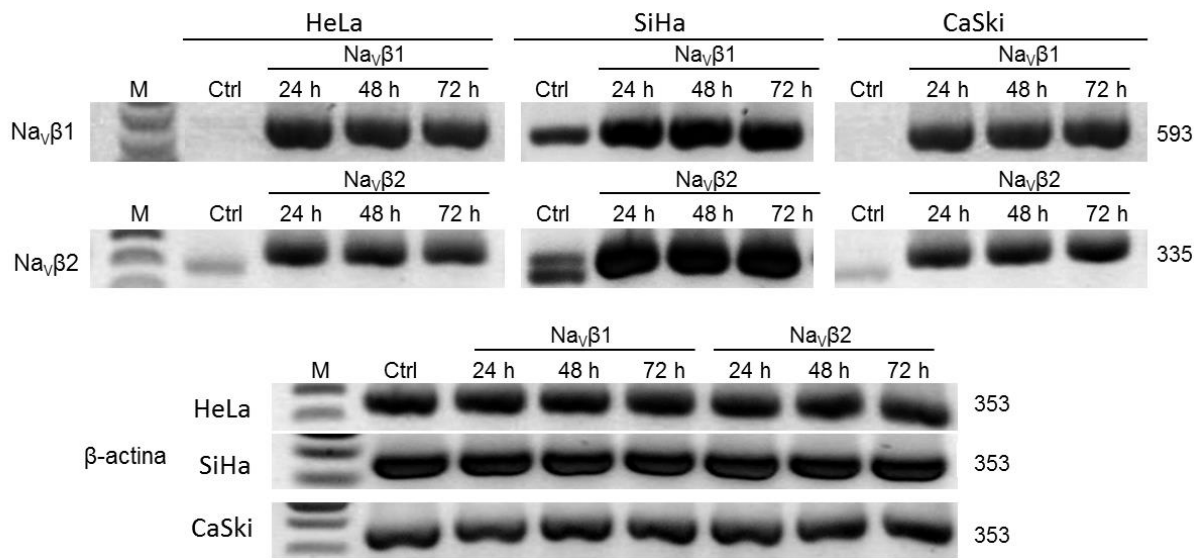
La eficiencia de silenciamiento de los *siRNAs* específicos dirigidos contra cada una de las subunidades  $\beta$ , se evaluó en las células HeLa y SiHa mediante qPCR a una concentración de 100

nM y a tres tiempos de incubación diferentes (24, 48 y 72 h). De esta manera se encontró que el mayor efecto de silenciamiento en células HeLa ocurre a las 72 h de iniciado el tratamiento con los *siRNAs*: el mensajero de Nav $\beta$ 1 disminuyó 43%; 80% el de Nav $\beta$ 2; 78% el de Nav $\beta$ 3; y alrededor del 56% el de Nav $\beta$ 4. En las células SiHa, la mayor disminución en el mRNA de Nav $\beta$ 1 se observó a las 24 h con un 65%; para Nav $\beta$ 2 a las 72 h con un 80%, en el caso de Nav $\beta$ 3 a las 24 h con un 58%, mientras que para Nav $\beta$ 4 fue a las 48h con un 83%. Estos resultados se presentan a manera de resumen en la **Fig. 17**.



**Figura 17. Disminución de la expresión relativa de los mensajeros de las subunidades  $\beta$  de los canales Nav en células HeLa y SiHa mediante la transfección de *siRNAs*.** La cuantificación del mensajero de las subunidades  $\beta$  por qPCR se realizó después de 24, 48 y 72 h de la transfección respectiva. Se muestran los niveles relativos del mRNA (en porcentaje) de cada una de las subunidades  $\beta$  señaladas en células HeLa (izquierda) y SiHa (derecha), después del tratamiento con 100 nM de los *siRNAs* respectivos. Los valores se normalizaron respecto al de las células que recibieron el mismo tratamiento de transfección, pero sin *siRNA* alguno. Resultados representativos de dos experimentos independientes. Se presentan los valores promedios  $\pm$  DE para cada condición.

Asimismo, las subunidades  $\text{Nav}\beta$ s fueron sobre expresadas en las células de CaCu por medio de transfecciones transitorias con el cDNA de cada una de ellas. Después de 24, 48 y 72 h post-transfección, el RNA total de las células se extrajo para identificar y evaluar al mensajero de cada subunidad mediante reacciones de RT-PCR estándar y posterior visualización en geles de agarosa (**Fig. 18**).



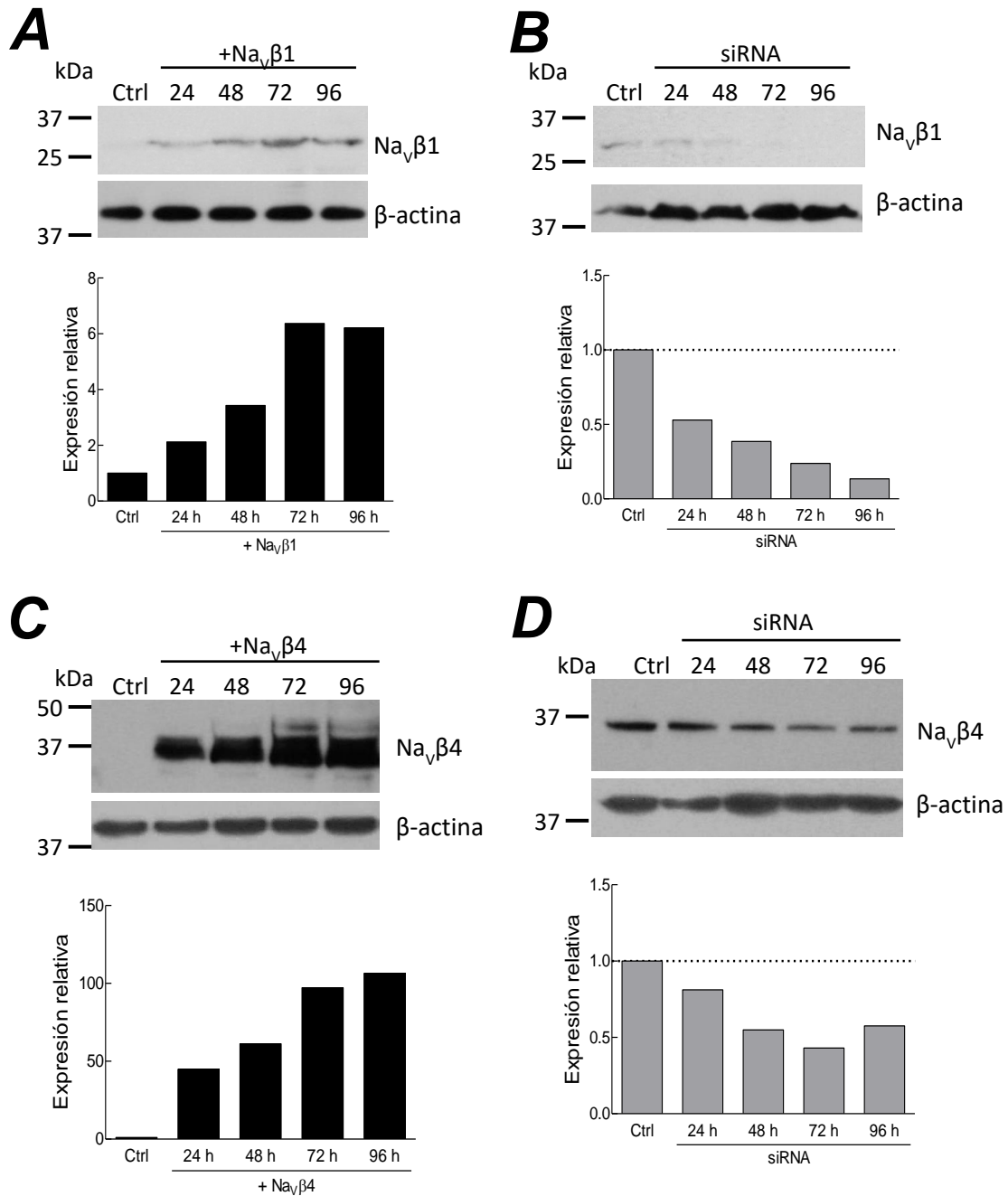
**Figura 18. Expresión del mRNA de  $\text{Nav}\beta$ 1 y  $\text{Nav}\beta$ 2 en células HeLa, SiHa y CaSki transfectadas.** Amplificación por RT-PCR estándar del mRNA de  $\text{Nav}\beta$ 1 y  $\text{Nav}\beta$ 2 en células HeLa, SiHa y CaSki transfectadas y no transfectadas con las subunidades respectivas. Se utilizaron *primers* específicos para las subunidades  $\beta$  de rata señaladas a la izquierda de cada panel. Como control de carga de RNA se utilizaron *primers* comerciales para amplificar el mRNA de  $\beta$ -actina (paneles inferiores). La separación de los productos de PCR se llevó a cabo en geles de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio. Los números a la derecha indican el número de pares de bases esperado para cada amplicón. Ctrl: células tratadas únicamente con el agente transfectante. M: marcador de peso molecular de 100 pb.

Los resultados confirmaron un aumento significativo en la cantidad del mensajero de las  $\text{Nav}\beta$ s en las células HeLa, SiHa y CaSki en respuesta a la transfección de éstas con las subunidades respectivas desde las 24 h posteriores a la transfección y de manera sostenida hasta al menos 72 h después de que se realizó la transfección.

Adicional a ello, por medio de western blot y posterior inmunodetección, se estudió el cambio en la expresión de las Nav $\beta$ s en células de CaCu a diferentes tiempos posteriores a la transfección con el plásmido de expresión de la subunidad respectiva (para fomentar la sobreexpresión), o bien con los *siRNAs* específicos para abatir la expresión de la proteína. Los resultados muestran un claro aumento en la expresión de las proteínas de ambas subunidades después de la transfección con los plásmidos correspondientes, desde las 24 h posteriores a la transfección del cDNA (**Fig. 19A y C**), así como una disminución en la expresión de las Nav $\beta$ s cuando las células son transfectadas con los *siRNAs* correspondientes (**Fig. 19B y D**). En conjunto, los datos de la **Fig. 19** demuestran que la modificación en la expresión de las subunidades Nav $\beta$ 1 y Nav $\beta$ 4 inducida por la transfección con los vectores de expresión o bien con los *siRNAs* específicos se mantiene durante el tiempo en el cual se realizaron los ensayos de proliferación, migración e invasividad.

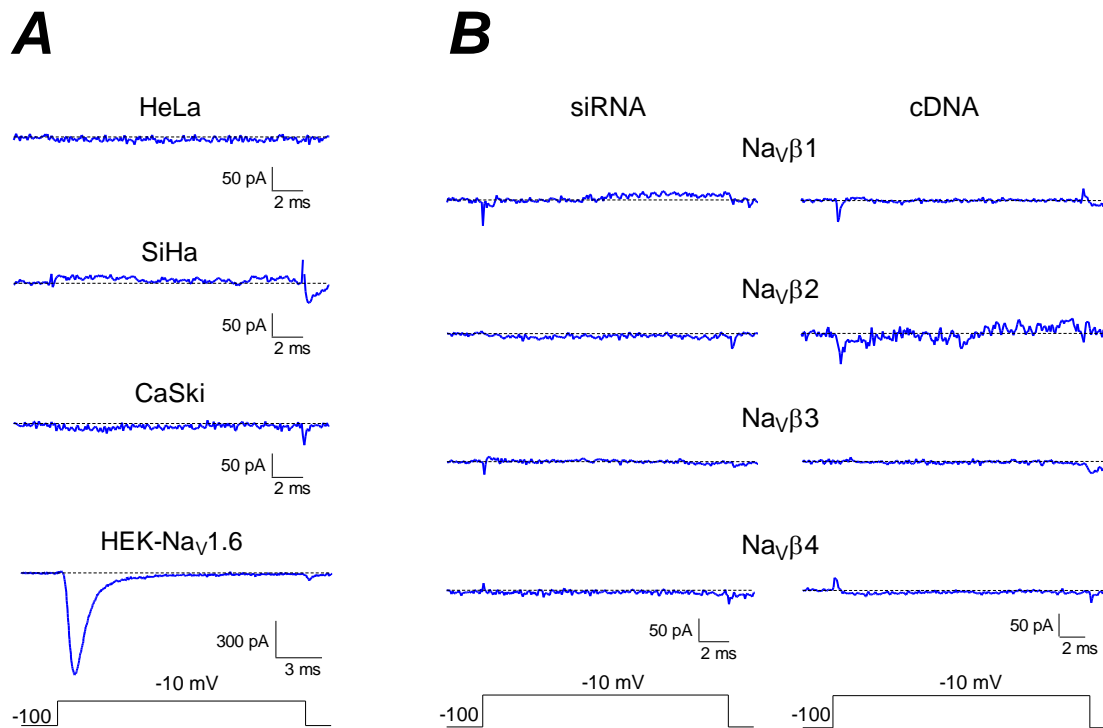
### **Registro de corrientes de sodio activadas por voltaje en células HeLa y SiHa después de inducir la sobreexpresión o el abatimiento de las Nav $\beta$ s**

Considerando las evidencias que demuestran la participación de las Nav $\beta$ s en el correcto transporte y localización de las subunidades  $\alpha$  en la membrana plasmática [72], decidimos investigar si la sola manipulación de la expresión de las subunidades  $\beta$  era suficiente para promover la expresión funcional de los canales Nav en la membrana plasmática de estas células. Con tal fin, las células HeLa y SiHa fueron sometidas a registros electrofisiológicos con la técnica de *patch-clamp* en la configuración de célula completa después de 24, 48, 72 y 96 h de haber sido transfectadas con los plásmidos de expresión de las subunidades  $\beta$  o bien con los *siRNAs* específicos para cada Nav $\beta$  (**Fig. 20**). En total, 130 células fueron registradas, y únicamente una de ellas presentó corrientes de sodio activadas por voltaje (**Tabla 6**). Se trata de una célula HeLa que fue tratada con *siRNAs* específicos para Nav $\beta$ 3 y cuyas corrientes se muestran en la **Fig. 21**.



**Figura 19. Expresión de Nav $\beta$ 1 y Nav $\beta$ 4 en células HeLa transfectadas.** Análisis por western blot de la expresión de las subunidades Nav $\beta$ 1 y Nav $\beta$ 4 en células HeLa transfectadas y no transfectadas (Ctrl) con los vectores de expresión de las subunidades respectivas (A) y (C), o bien con los siRNAs específicos para cada subunidad  $\beta$  (B) y (D). Se trata de un solo experimento representativo. En cada carril se depositaron 100  $\mu$ g de proteínas totales de células HeLa con el tratamiento indicado a diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96 h). La detección se realizó utilizando anticuerpos específicos para Nav $\beta$ 1 (A) y (B), y Nav $\beta$ 4 (C) y (D). Como control de carga (paneles inferiores), se realizó la inmunodetección de  $\beta$ -actina. El análisis cuantitativo se realizó con el programa ImageJ y se presenta en las gráficas de barras para cada serie de muestras estudiadas.





**Figura 20. Análisis de la corriente de sodio activada por voltaje en las células de CaCu.** Para investigar la presencia funcional de las subunidades  $\alpha$  de los canales  $\text{Na}_v$  en la membrana, se realizaron experimentos de *patch-clamp* en la modalidad de célula completa, mismos que demostraron que ninguna de las tres líneas celulares de CaCu expresan dichas corrientes (A), tal como se había demostrado anteriormente [94]. Por el contrario, sí se detectaron corrientes de sodio prominentes en células HEK-Nav<sub>v</sub>1.6 (panel inferior). Además, la manipulación de la expresión de las Nav $\beta$ s en células HeLa (B) ya sea con *siRNAs* o con el cDNA de cada subunidad  $\beta$ , no fue suficiente para promover la expresión funcional de las subunidades  $\alpha$  de los canales  $\text{Na}_v$  en la membrana, pues en más del 99% de los casos no se encontraron corrientes de sodio activadas por voltaje. Las corrientes de sodio fueron evocadas con pulsos despolarizantes a -10 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -100 mV.

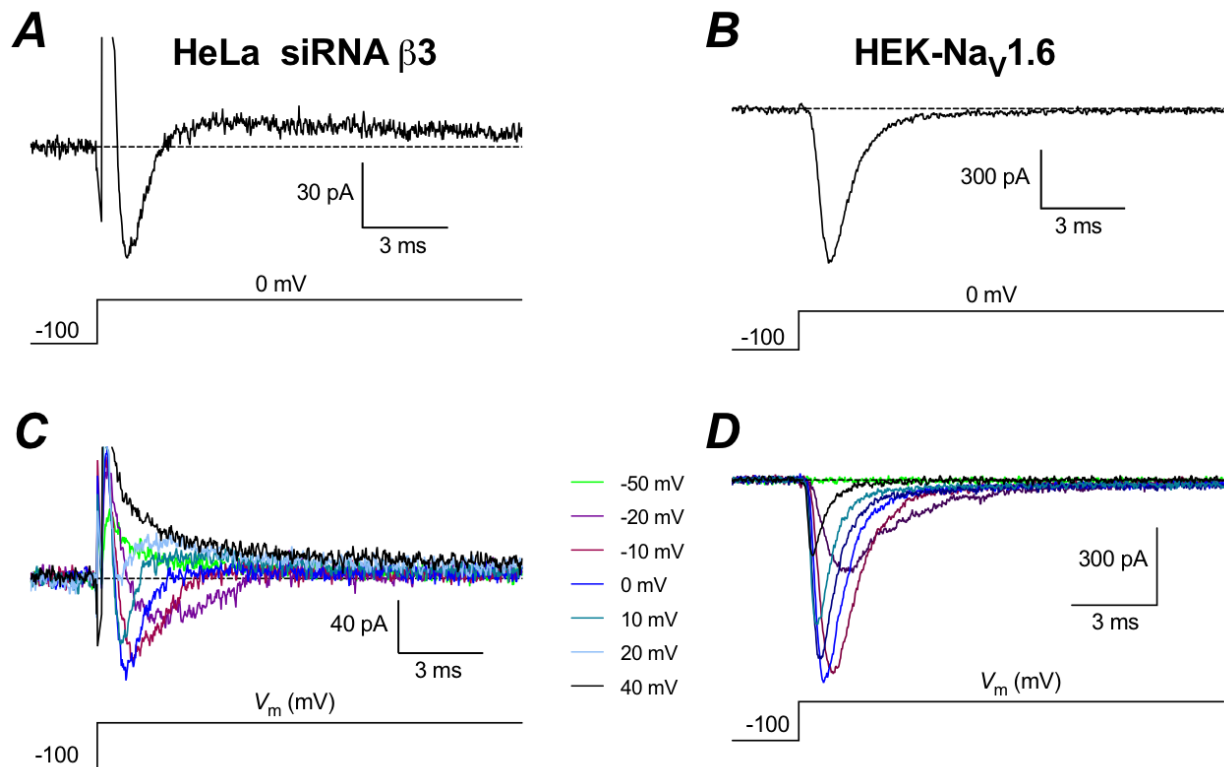
**Tabla 6. Células de CaCu que fueron sometidas a registros electrofisiológico**

Línea celular	Condición	Células registradas	Células con $I_{Na}$	Línea celular	Condición	Células registradas	Células con $I_{Na}$
HeLa	Control	10	-	SiHa	Control	10	-
	<i>siRNA</i> $Na_v\beta 1$	9	-		<i>siRNA</i> $Na_v\beta 1$	9	-
	<i>siRNA</i> $Na_v\beta 2$	5	-		<i>siRNA</i> $Na_v\beta 2$	6	-
	<i>siRNA</i> $Na_v\beta 3$	8	1		<i>siRNA</i> $Na_v\beta 3$	4	-
	<i>siRNA</i> $Na_v\beta 4$	9	-		<i>siRNA</i> $Na_v\beta 4$	6	-
	$Na_v\beta 1$ cDNA	10	-		$Na_v\beta 1$ cDNA	1	-
	$Na_v\beta 2$ cDNA	10	-		$Na_v\beta 2$ cDNA	1	-
	$Na_v\beta 3$ cDNA	12	-		$Na_v\beta 3$ cDNA	5	-
$Na_v\beta 4$ cDNA	12	-	$Na_v\beta 4$ cDNA	5	-		

Número de células estudiadas con la técnica de patch-clamp después de abatir o de inducir la sobreexpresión de las  $Na_v\beta$ s. Sólo una de ellas presentó corrientes de sodio activadas por voltaje ( $I_{Na}$ ).

La corriente de sodio registrada, si bien es pequeña (**Fig. 21A**), presenta un comportamiento temporal muy similar al de las células HEK- $Na_v1.6$  utilizadas como control positivo (**Fig. 21B**). Se puede observar que la amplitud de corriente es dependiente del voltaje al cual se produce el estímulo, siendo el pulso a 0 mV el que genera las corrientes más grandes en ambos casos (**Fig. 21C y D**).

Sin embargo, al ser éste el único caso en el cual se encontraron corrientes de sodio activadas por voltaje, no es posible establecer una relación entre la modificación en la expresión de las subunidades  $\beta$  y la aparición de canales  $Na_v$  funcionales en la membrana. En consecuencia, las modificaciones en la capacidad invasiva y de migración en respuesta a los cambios en la expresión de las subunidades  $\beta$  no pueden ser atribuidas a una actividad *de novo* de los canales  $Na_v$  en la membrana.

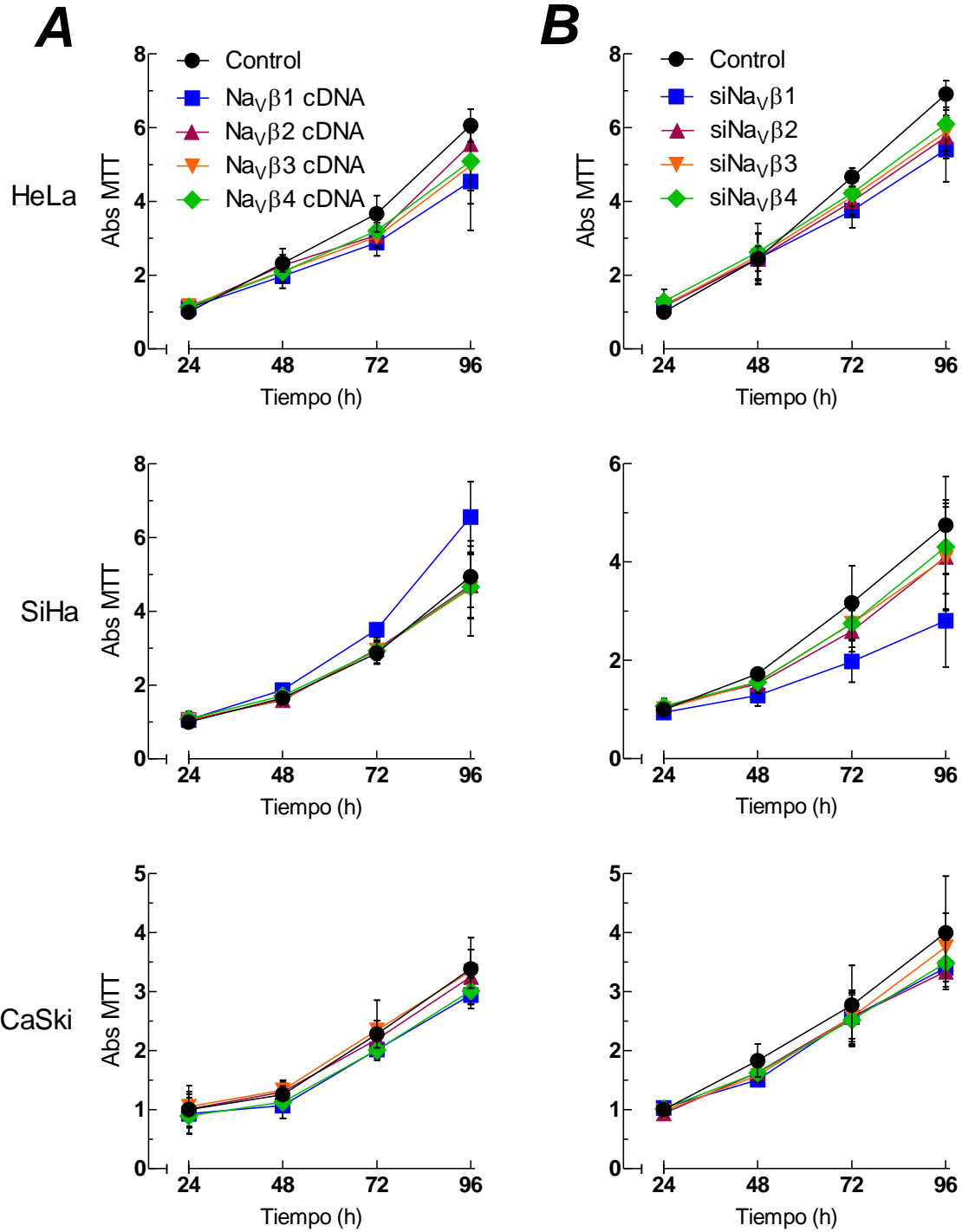


**Figura 21. Registro de corrientes de sodio activadas por voltaje en células HeLa.** Registros de corrientes de sodio a  $-10$  mV en una célula HeLa transfectada con el *siRNA* para  $\text{Nav}\beta 3$  (A), y en una célula HEK-Nav1.6 (B). Para cada célula se muestra la familia de corrientes de sodio (C, D) evocada por despolarizaciones a diferentes valores de  $V_m$  (indicados con líneas de colores). Las corrientes fueron obtenidas con la técnica de *patch-clamp* en la modalidad de célula completa aplicando los protocolos de voltaje mostrados en cada panel.

## Evaluación de la proliferación de células de CaCu por efecto de la expresión de subunidades Navβs

Los canales Nav no han sido relacionados con la capacidad de proliferación de las células cancerosas como lo han sido los canales de potasio [11]; no obstante, existen algunas evidencias de la posible participación de las Navβs en la producción de tumores de mayor tamaño en modelos xenográficos [91]; así como de la posible participación de estas proteínas, en específico Navβ3, en la promoción de la apoptosis [92]. Por lo anterior, decidimos estudiar la posible participación de estas proteínas en la proliferación celular. Para ello, los ensayos de proliferación se realizaron en las tres líneas celulares de CaCu a las 24, 48, 72 y 96 h después de haber sido transfectadas con el cDNA de cada una de las subunidades β, o bien con los *siRNAs* específicos para abatir la expresión de dichas proteínas.

Interesantemente, los resultados muestran una clara participación de la subunidad Navβ1 en la capacidad proliferativa únicamente de las células SiHa, ya que la sobreexpresión de dicha proteína se acompaña de un aumento en la proliferación de estas células, cuyo efecto es evidente a partir de las 72 h posteriores a la transfección (**Fig. 22A**, panel central). Acorde con este resultado, el abatimiento de la expresión de Navβ1 en estas mismas células produce una disminución en la proliferación, que de igual manera se hace evidente a partir de las 72 h (**Fig. 22B**, panel central). No obstante, estas diferencias no fueron significativas respecto al control ( $P = 0.09$  a las 96 h post-transfección con el cDNA;  $P = 0.07$  a las 96 h del tratamiento con *siRNAs*). Las otras tres subunidades Navβ al parecer no participan en la capacidad proliferativa de las células SiHa; y en el caso de las células HeLa y CaSki ninguna de las cuatro participa de forma relevante en esta propiedad, ya que no se encontraron diferencias significativas con respecto al control. Este resultado implica una peculiaridad de las células SiHa y no de un proceso que ocurre de forma general en el CaCu.



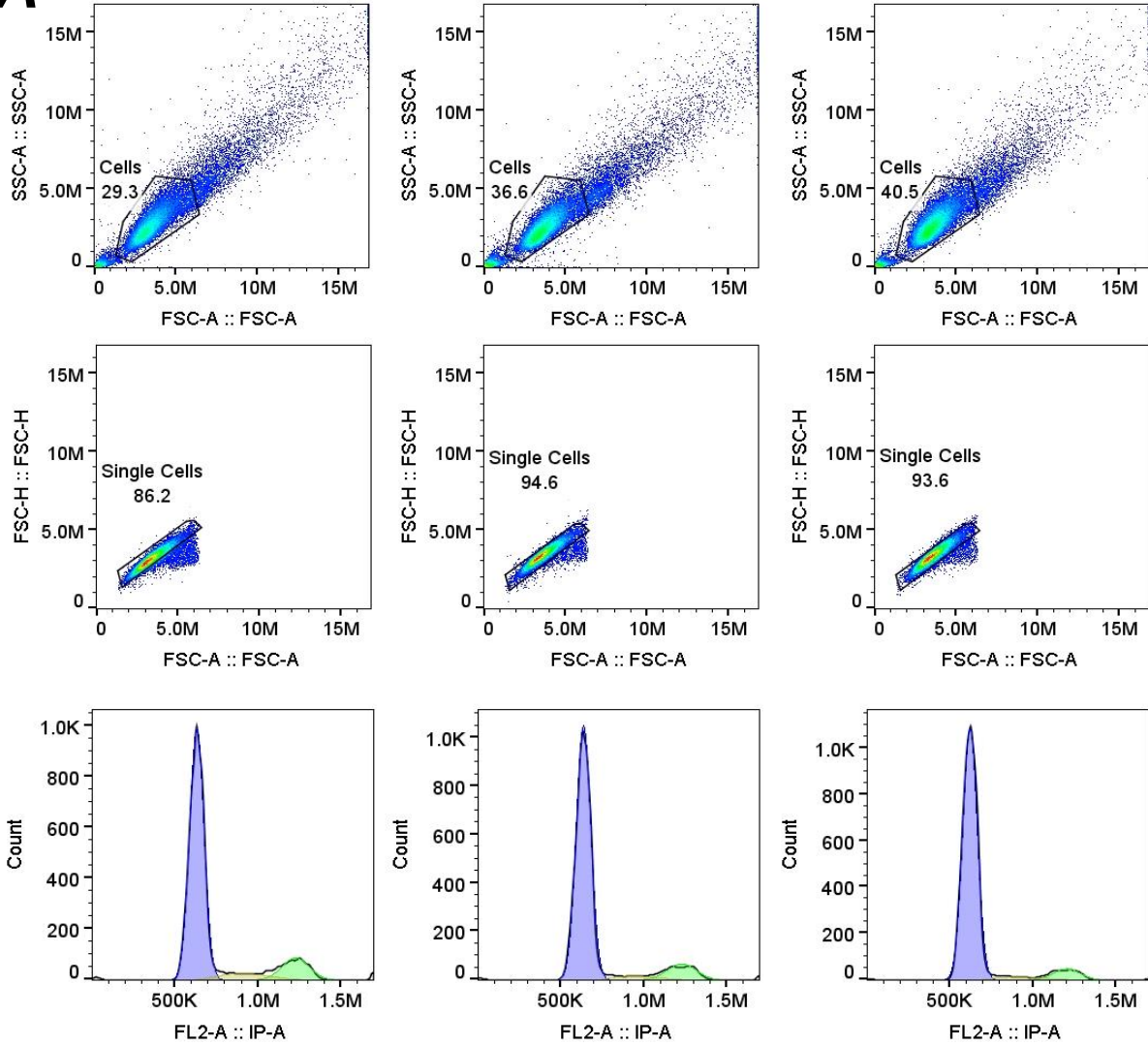
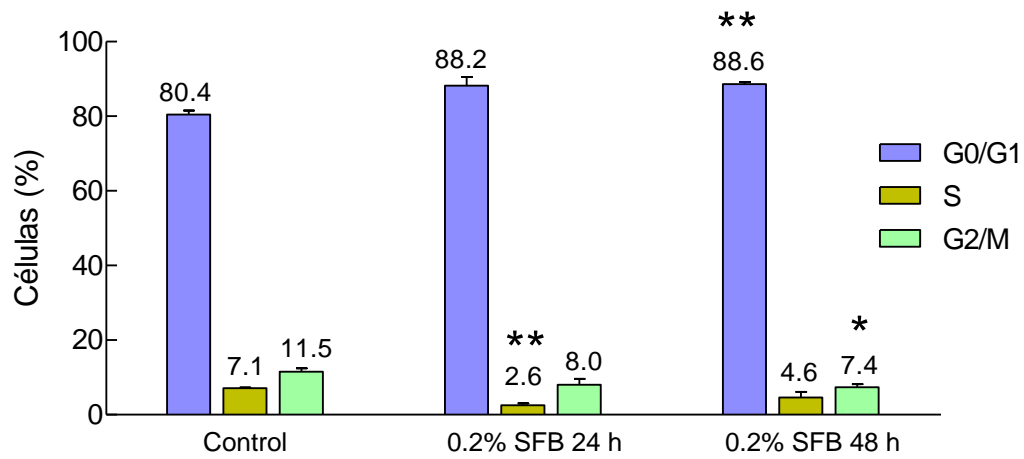
**Figura 22. Proliferación de células HeLa, SiHa y CaSki en respuesta a cambios en la expresión de las Navβs.** Datos de la absorbancia a 562 nm (promedios ± DE) como resultado de la reducción del MTT en función del tiempo post transfección de células HeLa (arriba), SiHa (centro) y CaSki (abajo) con vectores de expresión de cada una de las Navβs (A) o con los siRNAs contra dichas subunidades (B). Los datos se obtuvieron de tres experimentos independientes en donde cada una de las observaciones se realizó por triplicado. El control consiste en células tratadas únicamente con el agente transfectante correspondiente.

### **Análisis de la participación de Navβ1 en el ciclo celular de las células SiHa**

Para corroborar los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación con respecto a la participación de la subunidad Navβ1 en la proliferación de las células SiHa, decidimos realizar un análisis del ciclo celular por medio de citometría de flujo. Para tal propósito, como primer paso, se estandarizaron las mejores condiciones para arrestar a las células SiHa en la fase G0/G1, para lo cual las células sin transfectar fueron incubadas por 24 y 48 h en condiciones reducidas de SFB (0.2%), y se analizó el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular por medio de tinción con PI después de haber sido fijadas con etanol al 70% en frío y conservadas a -20 °C por al menos 24 h (**Fig. 23A**). Los resultados demuestran que, si bien el tratamiento por 24 h resulta en una disminución significativa en el porcentaje de células en la fase S con respecto a las células control, las mejores condiciones para obtener a la mayor proporción de células SiHa en la fase G0/G1 es incubándolas por 48 h en condiciones reducidas de SFB, pues el porcentaje de células en esta fase aumenta de forma significativa (de 80.4% en condiciones normales a 88.6% después del tratamiento), mientras que las células que se encuentran en la fase G2/M también disminuye significativamente (de 11.5% a 7.4%; **Fig. 23B**).

Una vez sincronizadas, las células fueron transfectadas con el cDNA de Navβ1 o con los *siRNAs* contra esta subunidad, según fuera el caso y, 48 h después, las células fueron analizadas por citometría de flujo con el procedimiento antes descrito.

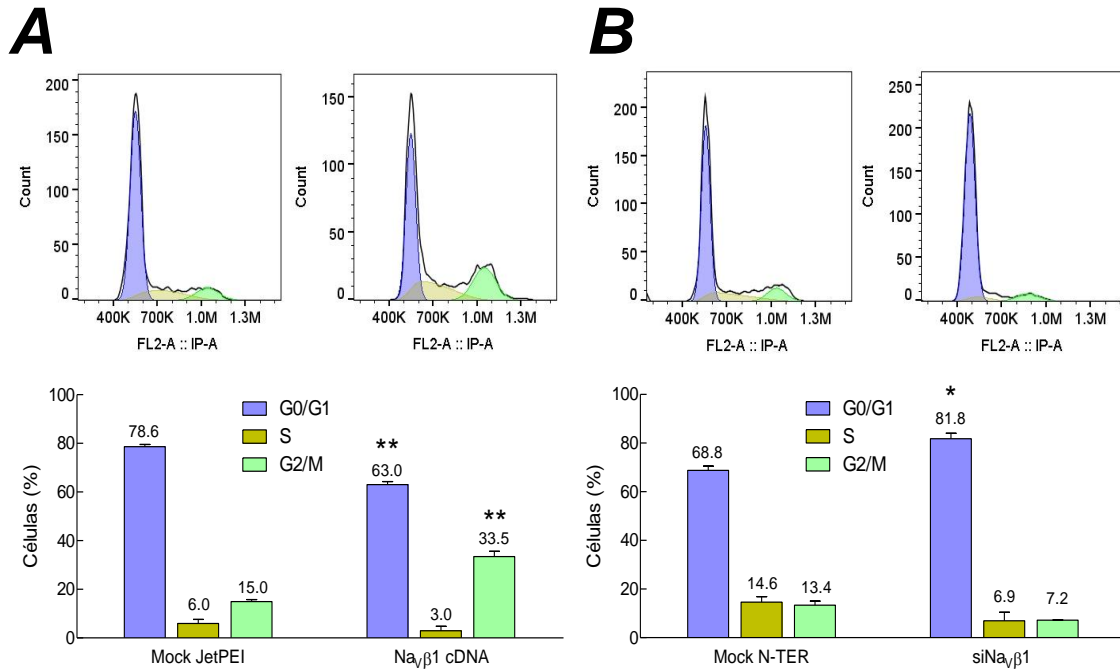
Los resultados muestran que hay un incremento significativo en la proporción de células que se encuentran en la fase G2/M cuando se sobre expresa la subunidad Navβ1 con respecto a las células que únicamente fueron sometidas al tratamiento con el agente transfectante (Mock JetPEI), junto con una disminución en la proporción de células que se encuentran en la fase G0/G1 (**Fig. 24A**). En el mismo sentido, el abatimiento de la expresión de Navβ1 conlleva a un aumento significativo en la proporción de células en la fase G0/G1 con respecto al control mock N-TER (únicamente con el reactivo transfectante; **Fig. 24B**). Estos resultados confirman la participación de la subunidad Navβ1 en la proliferación de las células SiHa.

**A****B**

---

**Figura 23 Sincronización de las células SiHa.** Resultados de citometría de flujo **(A)** en células SiHa sincronizadas mediante la incubación en 0.2% de SFB durante 24 h (columna central) y 48 h (derecha), en comparación con la condición control (10% SFB; columna izquierda). En un primer paso, las células fueron seleccionadas utilizando una gráfica de puntos (dot plot) FSC-A vs SSC-A (paneles superiores); después, a partir de esa primera población de células seleccionada, se realizó la sub-selección de células individuales (singuletes) mediante una gráfica de puntos FSC-A vs FSC-H (segunda fila); y por último, se realizó el análisis del porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular a partir de un histograma con el filtro FL2-A para detectar la fluorescencia del IP y el algoritmo Dean-Jett-Fox (tercera fila). Para cada condición se analizaron al menos  $2 \times 10^4$  singuletes. **(B)** Resumen de tres experimentos independientes como los descritos en **(A)**. Cada observación se realizó por triplicado; se grafican los promedios  $\pm$  DE del porcentaje relativo de células en cada una de las fases del ciclo celular. Diferencias significativas con respecto al control; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .



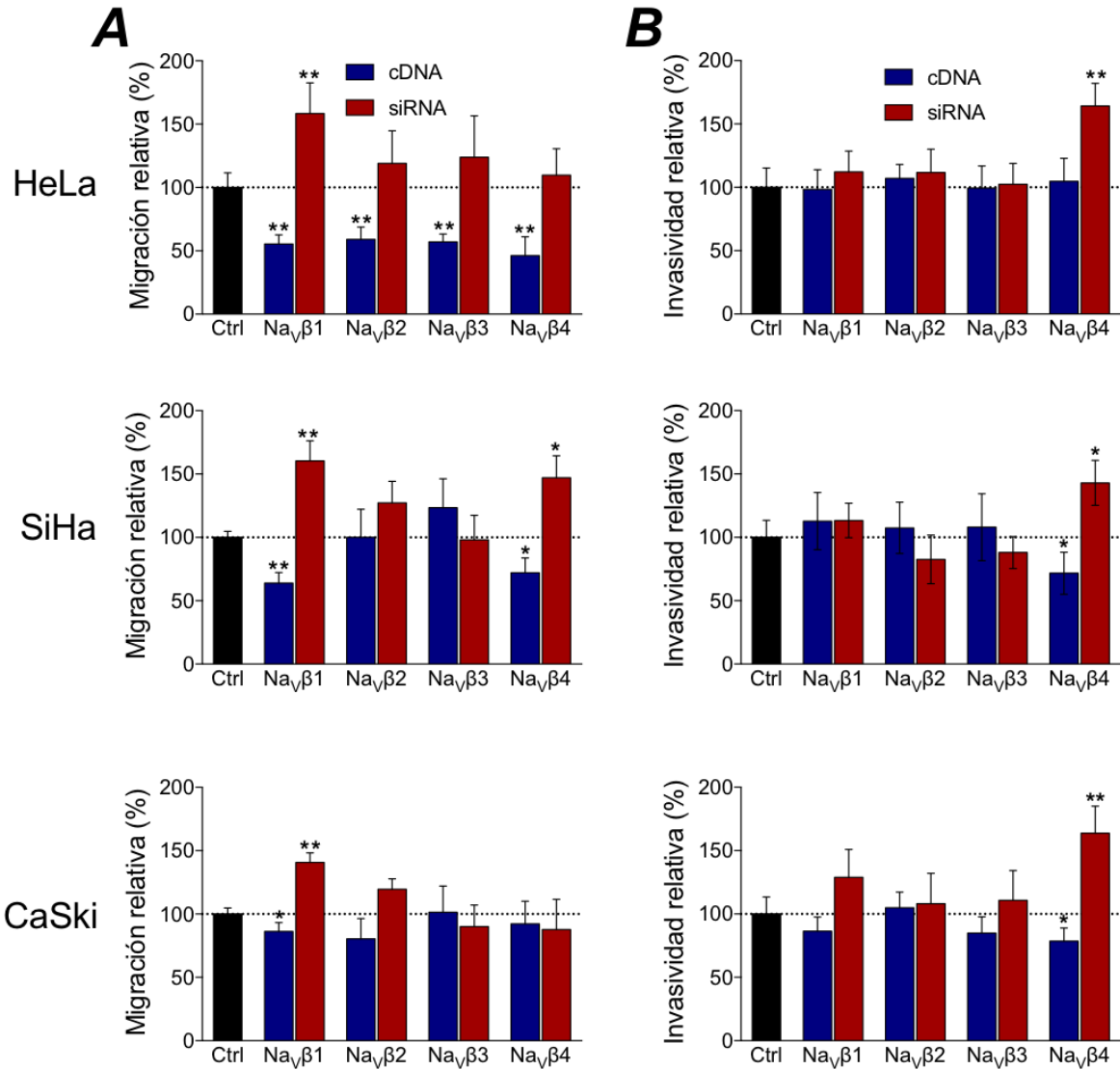


**Figura 24. Efecto de Navβ1 en el ciclo celular de las células SiHa.** El análisis del porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular se realizó por citometría de flujo en células SiHa al modificar la expresión de la subunidad Navβ1. Una vez sincronizadas, las células fueron transfectadas con el cDNA (A) o el siRNA (B) de Navβ1 y 48 h después las células fueron fijadas y posteriormente teñidas con IP. Para cada condición, al menos 2 x 10<sup>4</sup> singuletes fueron analizados. Se presentan los histogramas representativos de los controles Mock y de las células transfectadas (paneles superiores) de tres experimentos independientes resumidos en las gráficas de barras (paneles inferiores) mostrados como los promedios ± DE del porcentaje relativo de células en cada una de las fases del ciclo celular. Diferencias significativas con respecto al control; \*p<0.05, \*\*p<0.01.

### Participación de las Navβs en la migración e invasividad de las células de CaCu

Los ensayos de migración e invasividad *in vitro* se realizaron en cámaras de Boyden utilizando células HeLa, SiHa y CaSki tratadas con siRNAs (para abatir su expresión) o con cDNAs (para promover la sobreexpresión) dirigidos contra cada una de Navβs 48 h antes de iniciar los ensayos funcionales. Como control se utilizaron células tratadas únicamente con el agente transfectante. La cantidad de células que fueron capaces de migrar a través de la membrana de polietileno con poros de 8 μm de diámetro después de 48 h (migración), o bien la cantidad de células que fueron capaces de degradar el Matrigel™ y migrar a través de la membrana de polietileno después 48 h (invasividad) se determinó por reducción de MTT y medición de la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 562 nm.

La migración e invasividad relativas de cada condición con respecto a las células control se muestra en la **Fig. 25**, en la cual se puede observar que la sobreexpresión de las Nav $\beta$ s produce una fuerte disminución de la capacidad de migración de las células HeLa, reduciendo ésta en aproximadamente 50% en todos los casos. De manera congruente con estos resultados, el bloqueo de la expresión de la subunidad Nav $\beta$ 1 con *siRNAs* produce un aumento de más de 50% en la capacidad de migración de estas células con respecto a las células control, mientras que para el resto de las Nav $\beta$ s se observa una tendencia a una mayor capacidad de migración, siendo el tratamiento con *siRNAs* contra Nav $\beta$ 1 el que produjo el mayor aumento en la capacidad de migración de estas células (58% de incremento). En las células SiHa se encontró un resultado similar con Nav $\beta$ 1 y Nav $\beta$ 4; una reducción significativa en la capacidad de migrar (36% y 28%, respectivamente) cuando son sobre expresadas, y un incremento (60% y 47%, respectivamente) cuando su expresión es abatida, mientras que la manipulación de la expresión de Nav $\beta$ 2 y Nav $\beta$ 3 no tuvo un efecto en la migración de estas células. Finalmente, en las células CaSki, únicamente Nav $\beta$ 1 mostró una participación en la migración celular: la sobreexpresión de esta subunidad disminuyó la migración en un 14%, mientras que el tratamiento con *siRNAs* la incrementó en un 41%. Es importante destacar que la característica que se mantiene constante en las tres líneas celulares es la participación de Nav $\beta$ 1 como regulador negativo en la capacidad de migración celular *in vitro* (**Fig. 25A**) y que este efecto es similar a lo que ya se ha demostrado en líneas celulares de cáncer de mama [89], sugiriendo una participación de esta proteína en la capacidad de migrar en el cáncer cervicouterino.



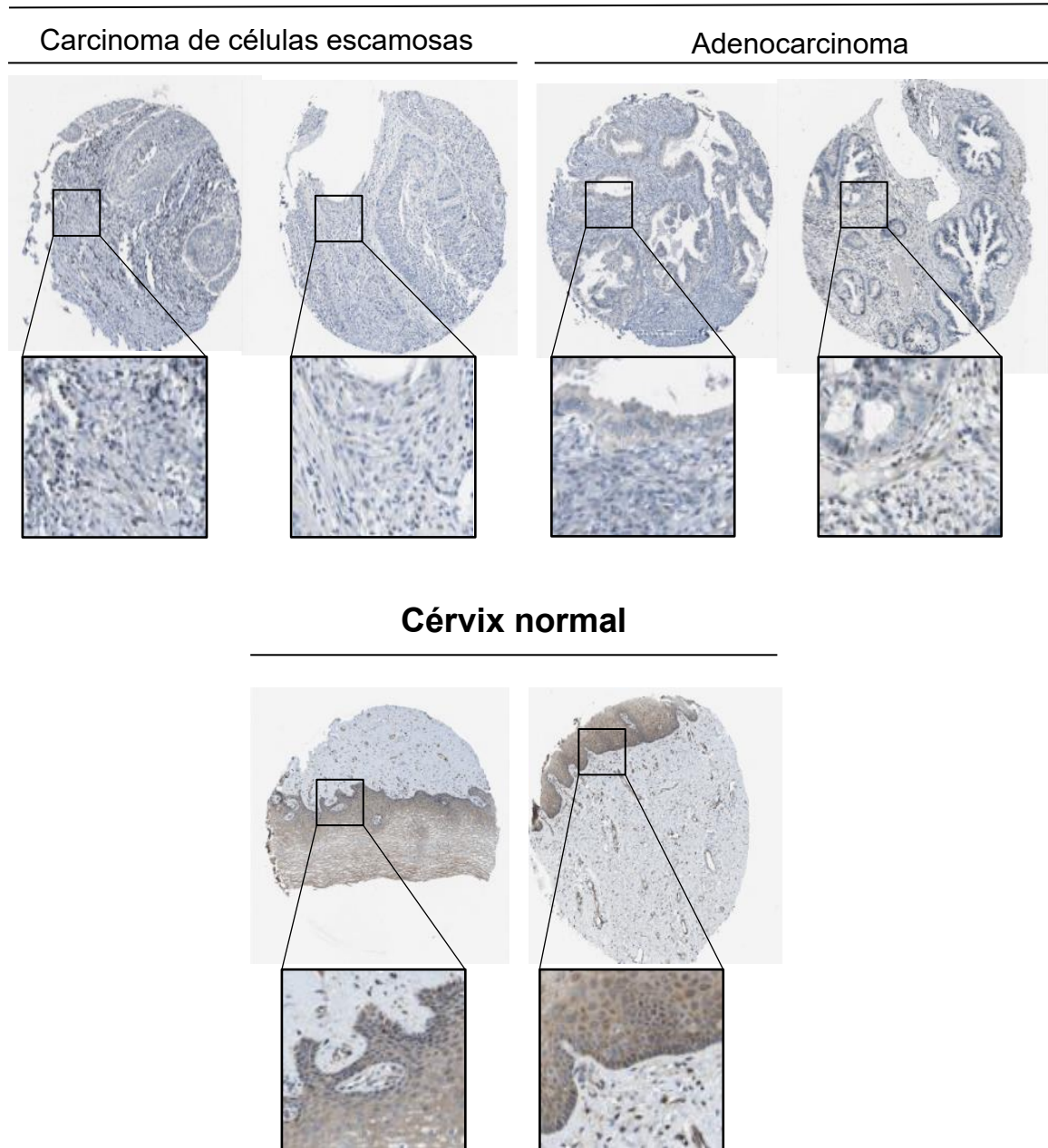
**Figura 25. Efecto en la capacidad de migración e invasividad de células HeLa, SiHa y CaSki en relación con la expresión de las subunidades  $Na_v\beta$ .** Porcentajes promedio  $\pm$  DE para la capacidad de migración (A) y de invasión (B) de las células HeLa (arriba), SiHa (centro) y CaSki (abajo) después 48 h de haber sido transfectadas con los cDNAs o con los *siRNAs* contra dichas subunidades. Los valores se normalizaron respecto a la condición control (Ctrl: células tratadas únicamente con el agente transfectante). Los datos se obtuvieron de al menos tres experimentos independientes, en donde cada condición se analizó por duplicado. Diferencias significativas con respecto al control; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

Por su parte, los resultados de los ensayos de invasividad muestran que el abatimiento en la expresión de la subunidad Nav $\beta$ 4 aumenta significativamente la capacidad invasiva de las tres líneas celulares; 64% en células HeLa, 43% en SiHa y 63% en CaSki, mientras que su sobre expresión en células SiHa y CaSki disminuye la invasividad en 28% y 21% respectivamente (**Fig. 25B**). El resto de las Nav $\beta$ s no mostraron participar en la capacidad invasiva de forma significativa en ninguna de las tres líneas celulares. Esto indica que Nav $\beta$ 4 es la subunidad que se encuentra mayoritariamente involucrada y de forma negativa con la capacidad invasiva de las células de CaCu.

### **Análisis *in silico* de la expresión de Nav $\beta$ 4 en biopsias de cáncer cervicouterino y cérvix no canceroso**

Con la finalidad de encontrar evidencias adicionales que apoyen los resultados obtenidos con las líneas celulares de CaCu, procedimos a realizar un análisis *in silico* de la expresión de Nav $\beta$ 4 en biopsias de cáncer cervicouterino y cérvix no canceroso, para lo cual hicimos uso de la base de datos del Human Protein Atlas ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)), en donde es posible encontrar una gran cantidad de información en cuanto a la expresión de diversas proteínas en varios tejidos y líneas celulares. En esta base de datos encontramos 12 biopsias de CaCu provenientes de diferentes pacientes en las que no se observó la presencia de Nav $\beta$ 4 por métodos inmunohistoquímicos (**Fig. 26A**); por el contrario, los cortes histológicos de tejido de cérvix sano sí mostraron una expresión moderada de esta proteína (**Fig. 26B**). Estos datos son consistentes con nuestros resultados experimentales que demuestran que la subunidad Nav $\beta$ 4 regula de forma negativa la capacidad de invadir de células, lo cual explica que las biopsias de CaCu muestren muy baja (o nula) expresión de esta proteína, mientras que en el tejido no canceroso sí se encuentra presente o es más abundante, sugiriendo una correlación entre el establecimiento del fenotipo canceroso y la regulación negativa de la expresión de Nav $\beta$ 4. El total de muestras de CaCu y cérvix no canceroso que se encuentran en dicho atlas y a las cuales se les hizo el análisis de expresión de Nav $\beta$ 4 se describen en la **Tabla 7**.

## Cáncer Cervicouterino



**Figura 26. Análisis in silico de la expresión de  $Na_v\beta_4$  en biopsias de CaCu y en cérvix no canceroso.** Se muestran imágenes representativas del análisis de la expresión de  $Na_v\beta_4$  por inmunohistoquímica en cuatro biopsias de CaCu (dos carcinomas de células escamosas y dos adenocarcinomas) y dos biopsias de cérvix no canceroso, en donde se hace evidente la ausencia de  $Na_v\beta_4$  en las biopsias cancerosas, mientras que sí se encuentra claramente presente en el tejido no canceroso. Todas las imágenes fueron obtenidas del Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>).

**Tabla 7. Biopsias de CaCu y cérvix no canceroso analizadas por inmunohistoquímica reportadas en el Human Protein Atlas**

Tipo de biopsia	ID de la paciente	Edad de la paciente (años)	Intensidad de la tinción contra Navβ4 en células glandulares	Localización principal	Intensidad de la tinción contra Navβ4 en células del epitelio escamoso	Localización principal
Tejido normal	3313	39	Fuerte	Nuclear	Moderado	Citoplasma/membrana
	2005	55	Fuerte	Nuclear	Moderada	Citoplasma/membrana
	1896	77	Fuerte	Nuclear	Moderada	Citoplasma/membrana
Tipo de carcinoma	ID de la paciente	Edad de la paciente (años)	Intensidad de la tinción contra Navβ4 en células tumorales			
Carcinoma de células escamosas	2841	32	No detectada			
	1716	39	No detectada			
	3333	35	No detectada			
	1751	34	No detectada			
	3409	63	No detectada			
	3400	46	No detectada			
	470	55	No detectada			
	3500	39	No detectada			
	3382	70	No detectada			
Adenocarcinoma	1881	86	No detectada			
	2480	44	No detectada			
	2528	44	No detectada			

Se presenta el total de muestras CaCu (carcinomas de células escamosas y adenocarcinomas) y de biopsias de tejido normal reportadas en el Human Protein Atlas a las cuales se les hizo el análisis de expresión de Navβ4 por inmunohistoquímica y los resultados de dicho análisis, así como el ID de la paciente y la edad de la misma (<http://www.proteinatlas.org/>).

Este conjunto de evidencias permite proponer a la subunidad Navβ4 como un marcador pronóstico en el CaCu, en donde una menor expresión indicaría una mayor naturaleza invasiva del cáncer.

## DISCUSIÓN

Durante muchos años, las subunidades  $\beta$  de los canales  $\text{Na}_v$  fueron consideradas únicamente como subunidades “auxiliares” o “accesorias”, ya que sus funciones conocidas se limitaban a la regulación de las propiedades electrofisiológicas de las subunidades  $\alpha$  de los canales  $\text{Na}_v$  (encargadas de la conducción de la corriente de sodio *per se*), así como del tráfico de éstas a la membrana plasmática. Hoy en día se han acumulado (y se siguen acumulando) un gran número de evidencias que demuestran la multifuncionalidad de estas proteínas en diferentes procesos celulares tales como la adhesión celular, el remodelado del citoesqueleto, la formación de filopodia e invadopodia, la regulación de la transcripción genética, e incluso la apoptosis, en forma conjunta con las subunidades  $\alpha$  o bien de forma independiente [97, 98].

En el presente trabajo utilizamos tres líneas celulares de CaCu, HeLa, SiHa y CasKi, cada una de ellas con diferentes características en cuanto al origen epitelial del cual surgieron, la raza de la persona a la que pertenecieron y el tipo de VPH que dio origen a la enfermedad; con la finalidad de cubrir un alto porcentaje de casos de CaCu (alrededor del 70%) para analizar la posible participación de las  $\text{Na}_v\beta$ s en el fenotipo maligno de este carcinoma. El planteamiento de esta interrogante no fue trivial ya que nuestras observaciones previas indicaban que estas proteínas se expresan en niveles significativos en las tres líneas celulares mencionadas aun en ausencia de la expresión funcional de subunidades  $\alpha$  en la membrana plasmática (evidenciado por la ausencia de corrientes de sodio activadas por voltaje).

Los resultados del presente trabajo de tesis demuestran que las células HeLa son las más agresivas desde el punto de vista de la carcinogénesis, pues son las que tienen una mayor capacidad de proliferación, migración e invasividad. En segundo lugar de agresividad se ubicaron las células SiHa, mientras que las células CaSki mostraron ser las menos agresivas. Hasta donde sabemos, ésta es la primera vez que se reporta la comparación de las características metastásicas en estas tres líneas celulares de CaCu. Resulta interesante que las células HeLa que son positivas a VPH-18 sean más metastásicas que aquellas que contienen al VPH-16, sin importar que más del 50% del total de los casos de CaCu son generados por infección con el VPH-16 mientras que el VPH-18 se presenta solo en aproximadamente el 18% de los tumores de CaCu [7]. Lo anterior sugiere que la alta frecuencia con la que infecta el VPH-

16 no se relaciona necesariamente con una mayor capacidad metastásica del mismo. De hecho, diversos estudios epidemiológicos han demostrado que las pacientes con CaCu positivo al VPH-18 tienen una menor sobrevida en comparación con aquellas positivas al VPH-16 [99, 100].

Una vez caracterizadas las propiedades metastásicas de las tres líneas celulares de CaCu, el siguiente objetivo fue estudiar los efectos de las subunidades  $\beta$  en dicho comportamiento celular. En primer lugar, nuestros experimentos de proliferación mostraron que la sobreexpresión de la subunidad  $\text{Nav}\beta 1$  produce un claro aumento en la capacidad de proliferación de las células SiHa, mientras que al reducir su expresión con *siRNAs* se observó el efecto contrario. Tales resultados fueron confirmados mediante ensayos de citometría, los cuales evidenciaron un aumento significativo del porcentaje de células que se encuentran en la fase G2/M cuando se induce la sobreexpresión de la proteína, mientras que al abatirla hay una mayor proporción de células que se quedan en la fase G0/G1 en comparación con las células control.

Esta no es la primera vez que se encuentra una relación entre  $\text{Nav}\beta 1$  y la proliferación celular en cáncer. En 2014, el grupo del Dr. Brackenbury reportó que la sobreexpresión de  $\text{Nav}\beta 1$  en células MDA-MB-231 de cáncer de mama incrementa sustancialmente el crecimiento tumoral en un modelo xenográfico (ratones inmunodeficientes a los cuales se les inyecta un número conocido de dichas células), acompañado de un incremento en la vascularización tumoral y una disminución en la apoptosis [91]. A la fecha, no obstante, no se conocen las vías de señalización por las cuales se presentan estos fenómenos. El estudio antes mencionado únicamente se realizó en una línea celular, por lo que no se puede asegurar que sea un fenómeno que caracterice a todos los casos de cáncer de mama. En el presente trabajo encontramos que  $\text{Nav}\beta 1$  participa en la proliferación de solo una de las tres líneas celulares de CaCu estudiadas, por lo que no podemos afirmar que sea un fenómeno que ocurre de forma general en este carcinoma. Nuestros experimentos no aportan ninguna evidencia sobre el posible mecanismo involucrado en dicho fenómeno, aunque es probable que se deba a diferentes perfiles de expresión de otro tipo de proteínas (por ejemplo, algunas proteínas de adhesión) que pudieran interactuar de manera directa o indirecta con la subunidad  $\text{Nav}\beta 1$ . En

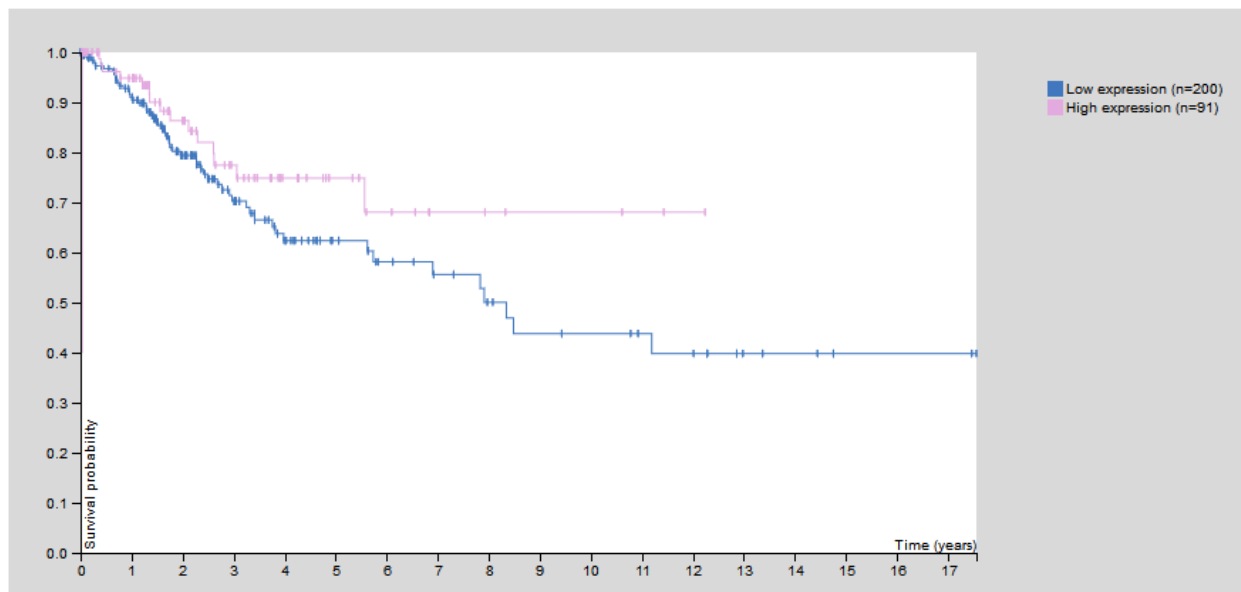


la actualidad es bien sabido que el paso por las distintas fases del ciclo celular afecta a la adhesión celular y, al contrario, la adhesión afecta al avance del ciclo celular. En específico, las cadherinas son moléculas de adhesión celular cuya expresión debe ser regulada a la baja para poder avanzar de la fase G1 a la fase S (E-cadherina) o bien de la fase G2 a la fase M (N-cadherina) [101]. Las subunidades  $\beta$ , por su parte, son también consideradas como moléculas de adhesión celular y se sabe además que interactúan físicamente entre ellas de forma trans-homofílica y con las cadherinas, así como con otras moléculas de adhesión [72]. Es factible que las diferencias en la participación de Nav $\beta$ 1 en la proliferación dependiente de la línea celular se deban a diferentes perfiles de expresión de otro tipo de proteínas de adhesión que pudieran interactuar de manera directa o indirecta con la subunidad Nav $\beta$ 1. Se necesita un análisis molecular más detallado para poder entender cuáles son las peculiaridades de esta línea celular que llevan a que la proliferación sea modificada por la manipulación en la expresión de Nav $\beta$ 1.

En segundo lugar, los resultados muestran una fuerte participación (regulación negativa) de las subunidades  $\beta$  de los canales Nav en la capacidad de migración principalmente de las células HeLa, ya que al sobre expresarlas esta capacidad disminuye de forma significativa (alrededor del 50%) en todos los casos. Un efecto similar pero no tan pronunciado ocurre con Nav $\beta$ 1 y Nav $\beta$ 4 en las células SiHa, con una disminución del 36% y 28% respectivamente, y en el caso de CaSki únicamente Nav $\beta$ 1 promueve una disminución significativa (14%) en la migración. En este mismo sentido, la inhibición de la expresión de Nav $\beta$ 1 tiene como consecuencia un aumento significativo en la migración de las tres líneas celulares (58, 60 y 41% en HeLa, SiHa y CaSki, respectivamente), mientras que la disminución de Nav $\beta$ 4 sólo promueve un aumento significativo en la migración de células SiHa en un 47%. La constante en el efecto sobre la migración de las tres líneas celulares fue la asociada con los niveles de expresión de Nav $\beta$ 1, y probablemente esto se deba a las características que comparten las Nav $\beta$ s con las moléculas de adhesión celular, de tal manera que al disminuir su expresión hay una menor adhesión célula-célula y por lo tanto una mayor capacidad de migrar, tal como ya se ha observado en líneas celulares de cáncer de mama *in vitro* [89]. Estos resultados sugieren que la participación

de  $\text{Nav}\beta 1$  en la migración celular es independiente del tipo de VPH presente en las células o bien si se trata de un tumor primario o no.

Haciendo un análisis *in silico* en la base de datos del Human Protein Atlas ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)) para la expresión de  $\text{Nav}\beta 1$  en CaCu encontramos que, si bien no se cuenta con información sobre la expresión a nivel de proteína, sí se tiene un estudio de sobrevida de pacientes con CaCu dependiente de los niveles de expresión del mRNA de  $\text{Nav}\beta 1$  (**Fig. 27**). Los datos muestran que las pacientes que tienen una alta expresión de dicha subunidad tienen una mayor sobrevida. Esto podría explicarse al menos parcialmente con los resultados del presente trabajo de tesis: la subunidad  $\text{Nav}\beta 1$  regula de forma negativa la capacidad de migración de las células, lo que implicaría que aquellas pacientes que presentan una baja expresión de dicha subunidad tienen un mal pronóstico.



**Figura 27. Estudio de sobrevida de pacientes con CaCu dependiente de la expresión de  $\text{Nav}\beta 1$ .** Se muestra la curva Kaplan-Meier obtenida del Human Protein Atlas realizada a partir del seguimiento de 291 pacientes con CaCu por al menos doce años, clasificadas en dos grupos de acuerdo con la expresión del mRNA de  $\text{Nav}\beta 1$  (azul; baja expresión  $n=200$ , y rosa; alta expresión  $n=91$ ). Se observa que las pacientes con una baja expresión de  $\text{Nav}\beta 1$  tienen una menor sobrevida que aquellas que la expresan en altas cantidades. Obtenida de [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org).

Finalmente, los cambios sustanciales observados en la capacidad de migración celular dependiente de la expresión de las subunidades  $\beta$ , no se ven reflejados en cambios en la capacidad invasiva cuando la expresión de  $\text{Nav}\beta 1$ ,  $\text{Nav}\beta 2$  y  $\text{Nav}\beta 3$  es modificada en células HeLa, SiHa y CaSki, pero sí cuando la expresión de la subunidad  $\text{Nav}\beta 4$  es abatida en las tres líneas celulares estudiadas. Consultando nuevamente el Human Protein Atlas, encontramos que en ninguna de las 12 biopsias de CaCu analizadas provenientes de pacientes diferentes fue posible detectar la presencia de  $\text{Nav}\beta 4$  por inmunohistoquímica, mientras que los cortes histológicos de tejido de cérvix sano muestran una expresión moderada de esta proteína. En concordancia con ello, de las tres líneas celulares de CaCu estudiadas en el presente trabajo, la que menos expresa  $\text{Nav}\beta 4$  son las células HeLa, que a su vez son las más invasivas. Con estas evidencias podemos sugerir a la subunidad  $\text{Nav}\beta 4$  como un marcador pronóstico en el CaCu, en donde una menor expresión indicaría una mayor naturaleza invasiva del cáncer.

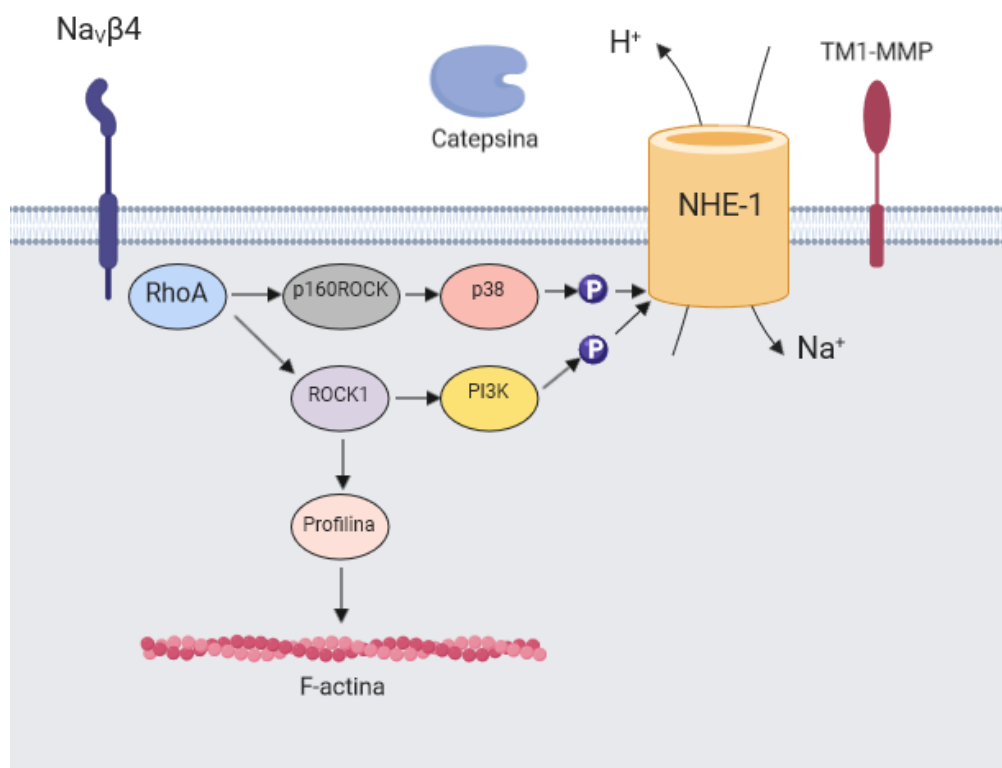
Recientemente, el grupo del Dr. Roger, de la Universidad de Tours en Francia, ha demostrado que la inhibición en la expresión de  $\text{Nav}\beta 4$  por medio de *siRNAs* en líneas celulares de cáncer de mama promueve un aumento en la capacidad invasiva de estas células. Aunado a ello, encontraron que este efecto no es debido a un cambio en la expresión o actividad del canal  $\text{Nav}1.5$  (mismo que se encuentra sobre expresado en el cáncer de mama) ni de ningún otro  $\text{Nav}$ , así como tampoco se debe a una mayor degradación de la matriz extracelular por proteasas. En cambio, lo que ellos encontraron fue que la actividad de la GTPasa RhoA aumenta en ausencia de la subunidad  $\text{Nav}\beta 4$ , lo cual conlleva a un aumento de la transición morfológica de las células de una forma elongada a una forma ameboide, favoreciendo así su capacidad para desplazarse y por lo tanto para invadir [98]. Es probable que en el CaCu suceda algo similar pues en las tres líneas celulares estudiadas la capacidad invasiva aumenta al abatir la expresión de  $\text{Nav}\beta 4$ , y este fenómeno no está relacionado con un posible aumento (o aparición) de la expresión de subunidades  $\alpha$  funcionales (generadoras de corrientes de sodio activadas por voltaje) en la membrana, tal como lo pudimos corroborar con los registros electrofisiológicos realizados en estas células. Sin embargo, parece poco probable que el cambio en la morfología de las células sea la única razón por la cual se observa este fenómeno, dado que los efectos en la migración no son tan pronunciados al abatir la expresión de  $\text{Nav}\beta 4$ ,

es decir, que el solo cambio en la movilidad de las células no puede explicar el aumento significativo en la invasividad. Es muy probable que haya otros mecanismos celulares involucrados en este fenómeno y para lo cual es necesario continuar con la investigación de posibles vías que aún no han sido estudiadas.

Una particularidad de las células cancerosas es que presentan un balance ácido-base completamente diferente a lo observado en tejidos normales, y que la acidificación del microambiente extracelular está ligado a la malignidad de las células. Si bien existen múltiples mecanismos celulares involucrados en dicho fenómeno, la actividad de NHE1 es considerada como la principal responsable de la acidificación perimembranal de las células cancerosas [102]. En este contexto, diversos estudios han demostrado la participación del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE1) en la capacidad invasiva de diversos tipos de cáncer, al bombear iones  $\text{H}^+$  al exterior de la célula, lo que produce la acidificación del ambiente perimembranal, favoreciendo la actividad de proteasas tales como las catepsinas y las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) y por ende aumentando la degradación de la matriz extracelular [32, 33, 103, 104]. Recientemente, nuestro propio grupo de investigación también reportó un incremento en la expresión del intercambiador NHE1, así como de la MMP tipo 2, asociada al aumento de la invasividad promovida por la actividad del canal  $\text{Na}_v1.6$  en una línea celular de CaCu [51].

La actividad del NHE1 está regulada por diversos mecanismos, entre los cuales destaca la fosforilación de varios residuos del extremo carboxilo intracelular que puede ser mediada por una gran variedad de cinasas; no obstante, una de las vías más descritas es la vía RhoA/p160ROCK/p38MAPK/NHE1, así como la ruta RhoA/ROCK1/PI3K/NHE1 [105-107]. Tomando en cuenta estas evidencias y los resultados del presente trabajo de tesis, es posible proponer un modelo (esquemático en **Fig. 28**) donde la disminución/ausencia de  $\text{Na}_v\beta4$  en el CaCu promueve la activación de RhoA (tal como se ha descrito en cáncer de mama), el remodelado del citoesqueleto y la fosforilación de NHE1 por las vías antes mencionadas, favoreciendo la actividad de las proteasas en el espacio perimembranal y con ello aumentando la capacidad invasiva de las células.

Resulta evidente que se requiere realizar experimentos adicionales para poder comprobar el modelo propuesto, lo cual forma parte de las perspectivas del presente trabajo de investigación. Independientemente del mecanismo que subyace a los efectos descritos en el presente trabajo para las subunidades  $\text{Nav}\beta 1$  y  $\text{Nav}\beta 4$  en el cáncer cervicouterino; estos hallazgos *per se* constituyen una evidencia más de la multifuncionalidad de las subunidades  $\beta$  de los canales  $\text{Nav}$ .



**Figura 28. Propuesta de modelo para la participación de  $\text{Nav}\beta 4$  en la invasividad.**  $\text{Nav}\beta 4$  interactúa físicamente con la proteína RhoA inhibiendo su actividad. En ausencia de  $\text{Nav}\beta 4$ , RhoA es liberada y activada, lo cual lleva a la remodelación del citoesqueleto a través de la vía RhoA/ROCK1/Profilina/f-actina, facilitando la migración de las células. Por otro lado, se promueve la fosforilación del NHE1 a través de las vías RhoA/p160ROCK/p38/NHE1 y RhoA/ROCK1/PI3K/NHE1, aumentando la actividad de dicho intercambiador, acidificando el espacio perimembranal, lo cual favorece la actividad de proteasas tales como las catepsinas y las MMP, aumentando la capacidad invasiva de las células.

## CONCLUSIONES

- Los cambios en la expresión de las Nav $\beta$ s por sí mismos no son suficientes para inducir una expresión funcional de los canales Nav en la membrana plasmática de células HeLa, SiHa o CaSki.
- La subunidad Nav $\beta$ 1 contribuye a la capacidad proliferativa de células SiHa: la sobreexpresión de dicha subunidad aumenta la proliferación, mientras que al abatir su expresión se obtiene el efecto contrario.
- La expresión de Nav $\beta$ 1 es inversamente proporcional a la capacidad de migración de las tres líneas celulares.
- La disminución en la expresión de Nav $\beta$ 4 produce un aumento significativo en la capacidad invasiva de las tres líneas celulares estudiadas, lo que permite sugerir a la subunidad Nav $\beta$ 4 como un posible marcador pronóstico en el CaCu.
- Estos resultados constituyen una evidencia más de la multifuncionalidad de las subunidades  $\beta$  de los canales de sodio activados por voltaje.

## REFERENCIAS

1. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
2. Steben, M. and E. Duarte-Franco, *Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology*. Gynecol Oncol, 2007. **107**(2 Suppl 1): p. S2-5.
3. de Freitas, A.C., et al., *Susceptibility to cervical cancer: an overview*. Gynecol Oncol, 2012. **126**(2): p. 304-11.
4. Munoz, N., et al., *Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer*. N Engl J Med, 2003. **348**(6): p. 518-27.
5. Woodman, C.B., S.I. Collins, and L.S. Young, *The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(1): p. 11-22.
6. Schiffman, M., et al., *Human papillomavirus and cervical cancer*. Lancet, 2007. **370**(9590): p. 890-907.
7. Roden, R. and T.C. Wu, *How will HPV vaccines affect cervical cancer?* Nat Rev Cancer, 2006. **6**(10): p. 753-63.
8. Gupta, S., P. Kumar, and B.C. Das, *HPV: Molecular pathways and targets*. Curr Probl Cancer, 2018. **42**(2): p. 161-174.
9. Alonso de Ruiz, P., E.C. Lazcano Ponce, and M. Hernández Ávila, *Cáncer cervicouterino. Diagnóstico, prevención y control*. 2001, Universidad Nacional Autónoma de México: Editorial Panamericana.
10. Le Guennec, J.Y., et al., *Voltage-gated ion channels, new targets in anti-cancer research*. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2007. **2**(3): p. 189-202.
11. Prevarskaya, N., R. Skryma, and Y. Shuba, *Ion channels and the hallmarks of cancer*. Trends Mol Med, 2010. **16**(3): p. 107-21.
12. Pedersen, S.F. and C. Stock, *Ion channels and transporters in cancer: pathophysiology, regulation, and clinical potential*. Cancer Res, 2013. **73**(6): p. 1658-61.
13. Litan, A. and S.A. Langhans, *Cancer as a channelopathy: ion channels and pumps in tumor development and progression*. Front Cell Neurosci, 2015. **9**: p. 86.
14. Hille, B., *Ion channels of excitable membranes*. 3rd ed. 2001, Sunderland, Mass.: Sinauer. xviii, 814 p.
15. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of the Cell, Sixth Edition*. Molecular Biology of the Cell, Sixth Edition, 2015: p. 1-1342.
16. Peruzzo, R., et al., *Impact of intracellular ion channels on cancer development and progression*. Eur Biophys J, 2016. **45**(7): p. 685-707.
17. Catterall, W.A., *Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology*. J Physiol, 2012. **590**(Pt 11): p. 2577-89.
18. Catterall, W.A., *Forty Years of Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Epilepsy*. Neurochem Res, 2017. **42**(9): p. 2495-2504.
19. Payandeh, J., et al., *The crystal structure of a voltage-gated sodium channel*. Nature, 2011. **475**(7356): p. 353-8.
20. McCusker, E.C., et al., *Structure of a bacterial voltage-gated sodium channel pore reveals mechanisms of opening and closing*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 1102.
21. Zhang, X., et al., *Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel*. Nature, 2012. **486**(7401): p. 130-4.
22. Pan, X., et al., *Structure of the human voltage-gated sodium channel Nav1.4 in complex with beta1*. Science, 2018. **362**(6412).
23. Shen, H., et al., *Structures of human Nav1.7 channel in complex with auxiliary subunits and animal toxins*. Science, 2019. **363**(6433): p. 1303-1308.
24. Yu, F.H. and W.A. Catterall, *Overview of the voltage-gated sodium channel family*. Genome Biol, 2003. **4**(3): p. 207.
25. 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.
26. Roger, S., P. Besson, and 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.

27. 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.
28. Brackenbury, W.J., et al., *The neonatal splice variant of Nav1.5 potentiates in vitro invasive behaviour of MDA-MB-231 human breast cancer cells*. Breast Cancer Res Treat, 2007. **101**(2): p. 149-60.
29. Pan, H. and M.B. Djamgoz, *Biochemical constitution of extracellular medium is critical for control of human breast cancer MDA-MB-231 cell motility*. J Membr Biol, 2008. **223**(1): p. 27-36.
30. Gao, R., et al., *Functional expression of voltage-gated sodium channels Nav1.5 in human breast cancer cell line MDA-MB-231*. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2009. **29**(1): p. 64-7.
31. Nelson, M., et al., *The sodium channel-blocking antiepileptic drug phenytoin inhibits breast tumour growth and metastasis*. Mol Cancer, 2015. **14**(1): p. 13.
32. 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.
33. 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.
34. Nakajima, T., et al., *Eicosapentaenoic acid inhibits voltage-gated sodium channels and invasiveness in prostate cancer cells*. Br J Pharmacol, 2009. **156**(3): p. 420-31.
35. 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.
36. Smith, P., et al., *Sodium channel protein expression enhances the invasiveness of rat and human prostate cancer cells*. FEBS Lett, 1998. **423**(1): p. 19-24.
37. Fraser, S.P., et al., *Tetrodotoxin suppresses morphological enhancement of the metastatic MAT-LyLu rat prostate cancer cell line*. Cell Tissue Res, 1999. **295**(3): p. 505-12.
38. Diss, J.K., et al., *Expression profiles of voltage-gated Na(+) channel alpha-subunit genes in rat and human prostate cancer cell lines*. Prostate, 2001. **48**(3): p. 165-78.
39. Djamgoz, M.B.A., et al., *Directional movement of rat prostate cancer cells in direct-current electric field: involvement of voltage-gated Na+ channel activity*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 14): p. 2697-705.
40. Mycielska, M.E., et al., *Contribution of functional voltage-gated Na+ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: II. Secretory membrane activity*. J Cell Physiol, 2003. **195**(3): p. 461-9.
41. 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.
42. Krasowska, M., et al., *Patterning of endocytic vesicles and its control by voltage-gated Na+ channel activity in rat prostate cancer cells: fractal analyses*. Eur Biophys J, 2004. **33**(6): p. 535-42.
43. Palmer, C.P., et al., *Single cell adhesion measuring apparatus (SCAMA): application to cancer cell lines of different metastatic potential and voltage-gated Na+ channel expression*. Eur Biophys J, 2008. **37**(4): p. 359-68.
44. Grimes, J.A., et al., *Differential expression of voltage-activated Na+ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro*. FEBS Lett, 1995. **369**(2-3): p. 290-4.
45. Bennett, E.S., B.A. Smith, and J.M. Harper, *Voltage-gated Na+ channels confer invasive properties on human prostate cancer cells*. Pflugers Arch, 2004. **447**(6): p. 908-14.
46. Abdul, M. and N. Hoosein, *Voltage-gated sodium ion channels in prostate cancer: expression and activity*. Anticancer Res, 2002. **22**(3): p. 1727-30.
47. Brackenbury, W.J. and M.B. Djamgoz, *Nerve growth factor enhances voltage-gated Na+ channel activity and Transwell migration in Mat-LyLu rat prostate cancer cell line*. J Cell Physiol, 2007. **210**(3): p. 602-8.
48. Uysal-Onganer, P. and M.B. Djamgoz, *Epidermal growth factor potentiates in vitro metastatic behaviour of human prostate cancer PC-3M cells: involvement of voltage-gated sodium channel*. Mol Cancer, 2007. **6**: p. 76.
49. Ding, Y., et al., *Epidermal growth factor upregulates motility of Mat-LyLu rat prostate cancer cells partially via voltage-gated Na+ channel activity*. J Cell Physiol, 2008. **215**(1): p. 77-81.
50. 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.
51. Lopez-Charcas, O., et al., *The invasiveness of human cervical cancer associated to the function of Nav1.6 channels is mediated by MMP-2 activity*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 12995.



52. 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.
53. Pan, H., et al., *Vascular endothelial growth factor-C promotes the invasion of cervical cancer cells via upregulating the expression of voltage-gated sodium channel subtype Nav1.6*. Tumor, 2012. **32**(5): p. 313-319.
54. Gao, R., et al., *Expression of voltage-gated sodium channel alpha subunit in human ovarian cancer*. Oncol Rep, 2010. **23**(5): p. 1293-9.
55. House, C.D., et al., *Voltage-gated Na<sup>+</sup> channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion*. Cancer Res, 2010. **70**(17): p. 6957-67.
56. Guzel, R.M., et al., *Colorectal cancer invasiveness in vitro: Predominant contribution of neonatal Nav1.5 under normoxia and hypoxia*. J Cell Physiol, 2018.
57. 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.
58. Campbell, T.M., M.J. Main, and E.M. Fitzgerald, *Functional expression of the voltage-gated Na<sup>(+)</sup>-channel Nav1.7 is necessary for EGF-mediated invasion in human non-small cell lung cancer cells*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 21): p. 4939-49.
59. Blandino, J.K., et al., *Voltage-dependent sodium channels in human small-cell lung cancer cells: role in action potentials and inhibition by Lambert-Eaton syndrome IgG*. J Membr Biol, 1995. **143**(2): p. 153-63.
60. Onganer, P.U. and M.B. Djamgoz, *Small-cell lung cancer (human): potentiation of endocytic membrane activity by voltage-gated Na<sup>(+)</sup> channel expression in vitro*. J Membr Biol, 2005. **204**(2): p. 67-75.
61. Allen, D.H., A. Lepple-Wienhues, and M.D. Cahalan, *Ion channel phenotype of melanoma cell lines*. J Membr Biol, 1997. **155**(1): p. 27-34.
62. 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.
63. Fraser, S.P., et al., *T-lymphocyte invasiveness: control by voltage-gated Na<sup>+</sup> channel activity*. FEBS Lett, 2004. **569**(1-3): p. 191-4.
64. Huang, W., et al., *Identification and functional characterization of voltage-gated sodium channels in lymphocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **458**(2): p. 294-9.
65. Yamashita, N., et al., *Enhancement of voltage-gated Na<sup>+</sup> channel current associated with multidrug resistance in human leukemia cells*. Cancer Res, 1987. **47**(14): p. 3736-41.
66. 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.
67. Gu, X.Q., et al., *TTX-sensitive and -resistant Na<sup>+</sup> currents, and mRNA for the TTX-resistant rH1 channel, are expressed in B104 neuroblastoma cells*. J Neurophysiol, 1997. **77**(1): p. 236-46.
68. Ou, S.W., et al., *Tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> channels in human neuroblastoma cells are encoded by new variants of Nav1.5/SCN5A*. Eur J Neurosci, 2005. **22**(4): p. 793-801.
69. Vetter, I., et al., *Characterisation of Na<sup>(v)</sup> types endogenously expressed in human SH-SY5Y neuroblastoma cells*. Biochem Pharmacol, 2012. **83**(11): p. 1562-71.
70. Fulgenzi, G., et al., *Human neoplastic mesothelial cells express voltage-gated sodium channels involved in cell motility*. Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(7): p. 1146-59.
71. 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.
72. Isom, L.L., *Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary*. Neuroscientist, 2001. **7**(1): p. 42-54.
73. Isom, L.L., et al., *Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel*. Science, 1992. **256**(5058): p. 839-42.
74. Morgan, K., et al., *beta 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(5): p. 2308-13.
75. Yu, F.H., et al., *Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2*. J Neurosci, 2003. **23**(20): p. 7577-85.
76. Hanlon, M.R. and B.A. Wallace, *Structure and function of voltage-dependent ion channel regulatory beta subunits*. Biochemistry, 2002. **41**(9): p. 2886-94.
77. Johnson, D., et al., *The sialic acid component of the beta1 subunit modulates voltage-gated sodium channel function*. J Biol Chem, 2004. **279**(43): p. 44303-10.

78. Shimizu, H., et al., *Structure-based site-directed photo-crosslinking analyses of multimeric cell-adhesive interactions of voltage-gated sodium channel beta subunits*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 26618.
79. Nguyen, H.M., et al., *Modulation of voltage-gated K<sup>+</sup> channels by the sodium channel beta1 subunit*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(45): p. 18577-82.
80. Ratcliffe, C.F., et al., *Sodium channel beta1 and beta3 subunits associate with neurofascin through their extracellular immunoglobulin-like domain*. J Cell Biol, 2001. **154**(2): p. 427-34.
81. Xiao, Z.C., et al., *Tenascin-R is a functional modulator of sodium channel beta subunits*. J Biol Chem, 1999. **274**(37): p. 26511-7.
82. Isom, L.L., et al., *Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif*. Cell, 1995. **83**(3): p. 433-42.
83. Chen, C., et al., *Reduced sodium channel density, altered voltage dependence of inactivation, and increased susceptibility to seizures in mice lacking sodium channel beta 2-subunits*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(26): p. 17072-7.
84. Malhotra, J.D., et al., *Sodium channel beta subunits mediate homophilic cell adhesion and recruit ankyrin to points of cell-cell contact*. J Biol Chem, 2000. **275**(15): p. 11383-8.
85. Kim, D.Y., et al., *Presenilin/gamma-secretase-mediated cleavage of the voltage-gated sodium channel beta2-subunit regulates cell adhesion and migration*. J Biol Chem, 2005. **280**(24): p. 23251-61.
86. Kim, D.Y., et al., *BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(7): p. 755-64.
87. Diss, J.K., et al., *Beta-subunits of voltage-gated sodium channels in human prostate cancer: quantitative in vitro and in vivo analyses of mRNA expression*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2008. **11**(4): p. 325-33.
88. Jansson, K.H., et al., *Overexpression of the VSSC-associated CAM, beta-2, enhances LNCaP cell metastasis associated behavior*. Prostate, 2012. **72**(10): p. 1080-92.
89. Chioni, A.M., et al., *A novel adhesion molecule in human breast cancer cells: voltage-gated Na<sup>+</sup> channel beta1 subunit*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(5): p. 1216-27.
90. Andrikopoulos, P., et al., *Angiogenic functions of voltage-gated Na<sup>+</sup> Channels in human endothelial cells: modulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling*. J Biol Chem, 2011. **286**(19): p. 16846-60.
91. Nelson, M., et al., *The sodium channel beta1 subunit mediates outgrowth of neurite-like processes on breast cancer cells and promotes tumour growth and metastasis*. Int J Cancer, 2014. **135**(10): p. 2338-51.
92. Adachi, K., et al., *Identification of SCN3B as a novel p53-inducible proapoptotic gene*. Oncogene, 2004. **23**(47): p. 7791-7798.
93. Sanchez-Sandoval, A.L., *Expresión de canales de sodio en cáncer cervicouterino generado por VPH-18*, in Instituto de Fisiología Celular. 2011, Universidad Nacional Autónoma de México.
94. 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*, in Instituto de Fisiología Celular. 2013, Universidad Nacional Autónoma de México.
95. Livak, K.J. and 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.
96. Hamill, O.P., et al., *Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches*. Pflugers Arch, 1981. **391**(2): p. 85-100.
97. Brackenbury, W.J. and L.L. Isom, *Na Channel beta Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family*. Front Pharmacol, 2011. **2**: p. 53.
98. 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.
99. Lombard, I., et al., *Human papillomavirus genotype as a major determinant of the course of cervical cancer*. J Clin Oncol, 1998. **16**(8): p. 2613-9.
100. Rader, J.S., et al., *Genetic variations in human papillomavirus and cervical cancer outcomes*. Int J Cancer, 2019. **144**(9): p. 2206-2214.
101. Vinken, M., et al., *Non-channel functions of connexins in cell growth and cell death*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1818**(8): p. 2002-8.
102. Reshkin, S.J., R.A. Cardone, and S. Harguindey, *Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger, pH regulation and cancer*. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2013. **8**(1): p. 85-99.

103. Busco, G., et al., *NHE1 promotes invadopodial ECM proteolysis through acidification of the peri-invadopodial space*. FASEB J, 2010. **24**(10): p. 3903-15.
104. Lin, Y., et al., *NHE1 mediates MDA-MB-231 cells invasion through the regulation of MT1-MMP*. Exp Cell Res, 2011. **317**(14): p. 2031-40.
105. Tominaga, T., et al., *p160ROCK mediates RhoA activation of Na-H exchange*. EMBO J, 1998. **17**(16): p. 4712-22.
106. Bourguignon, L.Y., et al., *CD44 interaction with tiam1 promotes Rac1 signaling and hyaluronic acid-mediated breast tumor cell migration*. J Biol Chem, 2000. **275**(3): p. 1829-38.
107. Cardone, R.A., et al., *Protein kinase A gating of a pseudopodial-located RhoA/ROCK/p38/NHE1 signal module regulates invasion in breast cancer cell lines*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(7): p. 3117-27.

## **APÉNDICES**

Artículos publicados durante los estudios de doctorado

PRIMARY RESEARCH

Open Access



# Contribution of voltage-gated sodium channel $\beta$ -subunits to cervical cancer cells metastatic behavior

Ana Laura Sanchez-Sandoval and Juan Carlos Gomora\*

## Abstract

**Background:** Voltage-gated sodium ( $\text{Na}_v$ ) channels are heteromeric proteins consisting of a single pore forming  $\alpha$ -subunit associated with one or two auxiliary  $\beta$ -subunits. These channels are classically known for being responsible of action potential generation and propagation in excitable cells; but lately they have been reported as widely expressed and regulated in several human cancer types. We have previously demonstrated the overexpression of  $\text{Na}_v1.6$  channel in cervical cancer (CeCa) biopsies and primary cultures, and its contribution to cell migration and invasiveness. Here, we investigated the expression of  $\text{Na}_v$  channels  $\beta$ -subunits ( $\text{Na}_v\beta$ s) in the CeCa cell lines HeLa, SiHa and CaSki, and determined their contribution to cell proliferation, migration and invasiveness.

**Methods:** We assessed the expression of  $\text{Na}_v\beta$ s in CeCa cell lines by performing RT-PCR and western blotting experiments. We also evaluated CeCa cell lines proliferation, migration, and invasion by in vitro assays, both in basal conditions and after inducing changes in  $\text{Na}_v\beta$ s levels by transfecting specific cDNAs or siRNAs. The potential role of  $\text{Na}_v\beta$ s in modulating the expression of  $\text{Na}_v$   $\alpha$ -subunits in the plasma membrane of CeCa cells was examined by the patch-clamp whole-cell technique. Furthermore, we investigated the role of  $\text{Na}_v\beta1$  on cell cycle in SiHa cells by flow cytometry.

**Results:** We found that the four  $\text{Na}_v\beta$ s are expressed in the three CeCa cell lines, even in the absence of functional  $\text{Na}_v$   $\alpha$ -subunit expression in the plasma membrane. Functional in vitro assays showed differential roles for  $\text{Na}_v\beta1$  and  $\text{Na}_v\beta4$ , the latter as a cell invasiveness repressor and the former as a migration abolisher in CeCa cells. In silico analysis of  $\text{Na}_v\beta4$  expression in cervical tissues corroborated the downregulation of this protein expression in CeCa vs normal cervix, supporting the evidence of  $\text{Na}_v\beta4$ 's role as a cell invasiveness repressor.

**Conclusions:** Our results contribute to the recent conception about  $\text{Na}_v\beta$ s as multifunctional proteins involved in cell processes like ion channel regulation, cell adhesion and motility, and even in metastatic cell behaviors. These non-canonical functions of  $\text{Na}_v\beta$ s are independent of the presence of functional  $\text{Na}_v$   $\alpha$ -subunits in the plasma membrane and might represent a new therapeutic target for the treatment of cervical cancer.

**Keywords:** Voltage-gated sodium channel  $\beta$ -subunits, Cervical cancer, Proliferation, Migration, Invasion, Cell-adhesion molecule

\*Correspondence: jgomora@ifc.unam.mx

Departamento de Neuropatología Molecular, División de Neurociencias,  
Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México,  
04510 Mexico City, Mexico



## Background

Cervical cancer (CeCa) is the fourth most common cancer in women worldwide, with more than 500,000 new cases each year and an estimated 260,000 deaths, of which approximately 87% occur in developing countries [1]. Despite the implementation of vaccination against Human Papillomavirus infection, it will take decades before the impact on the cervical cancer incidence became clear, giving the natural history of this disease [2]. Therefore, it is necessary to better understand the biology of this type of cancer in order to improve the early detection and treatment.

Voltage-gated sodium ( $\text{Na}_V$ ) channels are heteromeric transmembrane proteins that consist of a single pore forming  $\alpha$ -subunit associated with one or more auxiliary  $\beta$ -subunits ( $\text{Na}_V\beta$ s) [3]. These channels are known to be responsible for action potential generation and propagation in excitable cells, but they are also widely expressed and upregulated in a variety of human cancer types, including breast, prostate, colon, ovarian, lung, gastric, melanoma, astrocytoma and uterine cervix, where the  $\text{Na}_V$   $\alpha$ -subunit activity has been associated mainly, but not exclusively, with cell motility and invasiveness [4–14]. So far, four  $\text{Na}_V\beta$ s ( $\text{Na}_V\beta 1$ – $\text{Na}_V\beta 4$ ) have been described. These are multifunctional type I transmembrane proteins that modulate  $\text{Na}_V$   $\alpha$ -subunit gating, localization and transit to the plasma membrane. Additionally, they possess a V-type immunoglobulin repeat in the extracellular domain similar to the family of neural cell adhesion molecules (CAMs), thus, their role as CAMs in a trans-homophilic and trans-heterophilic way, and with other molecules, in presence or absence of the  $\alpha$ -subunits has been described in numerous reports and in different expression systems [15–22].

The role of  $\text{Na}_V\beta$ s in cancer has also been studied, although not as widely as for the  $\alpha$ -subunits. In prostate cancer (PCa), it has been found that the overexpression of  $\text{Na}_V\beta$ s is associated with the increasing metastatic potential of PCa cell lines [23], and when overexpressing  $\text{Na}_V\beta 2$  in LnCaP cells, the cells acquired a fibroblastic-like morphology, became more invasive and had enhanced migration in vitro; in contrast, these cells had a reduced tumor volume in vivo [24, 25]. On the other hand, the overexpression of  $\text{Na}_V\beta 3$  in Saos-2 (osteosarcoma) and T98G (glioblastoma) cells, seems to activate an apoptotic pathway mediated by the tumor suppressor protein p53 [26]. However, most of the studies have been done in breast cancer, where it has been demonstrated that  $\text{Na}_V\beta 1$  is overexpressed in the low metastatic MCF-7 cell line vs highly metastatic MDA-MB-231 cells [27]. Overexpressing  $\text{Na}_V\beta 1$  in these last cells produced a drastic reduction on in vitro transwell migration and an increase in cellular adhesiveness. In contrast, MDA-MB-231 cells stably

transfected with  $\text{Na}_V\beta 1$  produced larger tumors in an in vivo model compared with those generated by wild type MDA-MB-231 cells. In addition, overexpression of  $\text{Na}_V\beta 1$  induced a reduction in caspase activity in these cells [28]. More recently, the potential role of  $\text{Na}_V\beta 4$  as a metastasis-suppressor gene has been described in breast cancer cells, associated with the small GTPase RhoA activity and therefore with the cytoskeleton remodeling during migration and invasiveness [29].

We have previously demonstrated the overexpression of  $\text{Na}_V$   $\alpha$ -subunits in cervical cancer biopsies vs non-cancerous cervix, and furthermore, we reported the functional expression of these proteins in primary cultures derived from human cervical cancer biopsies and their contribution to the cell migration and invasiveness. Specifically,  $\text{Na}_V 1.6$  showed to be the most overexpressed  $\alpha$ -subunit and the one responsible of the augmented invasive potential as the specific blockade of this channel was able to diminish the invasive potential with the same effectiveness as the blockade of all the  $\text{Na}_V$   $\alpha$ -subunits by TTX [14, 30]. In the present work, we investigated the electrophysiological activity of  $\text{Na}_V$  channels and the expression of  $\text{Na}_V\beta$ s in three cervical cancer cell lines (HeLa, SiHa and CaSki) as well as their contribution to three metastatic cell behaviors: in vitro proliferation, transwell migration and invasiveness.

## Methods

### Cell lines and cell culture

Cervical cancer cell lines SiHa, CaSki (both HPV-16 positive) and HeLa (HPV-18 positive) were grown in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin at 37 °C in a humidified 5%  $\text{CO}_2$  incubator. All cell culture reagents were purchased from Gibco-Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). The three cell lines were authenticated by short tandem repeat profiling prior to the experiments (data not shown).

### Overexpression and downregulation of $\text{Na}_V\beta$ s expression

Plasmids containing each of the  $\text{Na}_V\beta$ s from rat were kindly donated by Dr. L. Isom (University of Michigan). Overexpression of each  $\text{Na}_V\beta$  in CeCa cells was achieved by transient transfections using the JetPEI transfection reagent (PolyPlus Transfection; Illkirch, France), according to the manufacturer's instructions. On the other hand, downregulation of  $\text{Na}_V\beta$ s expression was performed using two or three different pre-designed siRNAs (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) for each  $\text{Na}_V\beta$  (100 nM each); in all cases, we chose the one with the best efficiency. Optimal siRNA transfection conditions were established previously by using 50 nM of siGLO Green Transfection Indicator (Sigma-Aldrich), a fluorescent

**Table 1 RT-PCR primers information**

mRNA	GenBank access	Primer pair sequence (5' → 3')	PCR Product (bp)	Annealing Temp (°C)
Na <sub>v</sub> β1	NM_001037	F: AGAAGGGCACTGAGGAGTTT R: GCAGCGATCTTCTGTAGCA	379	60
Na <sub>v</sub> β2	NM_004588	F: GCCCACCAGACTAACATCTC R: ATGCGGAAGTGGAGGAACA	285	62
Na <sub>v</sub> β3	NM_018400	F: CTGGCTTCTCTCGTGCTTAT R: TCAAACCTCCCGGACACATT	353	60
Na <sub>v</sub> β4	NM_174934	F: CACGCCACCATCTTCTCCAA R: TGCAGCTGCTCAGCCCGAAG	284	65
β-actin	NM_001101	F: GCTCGTCGTCGACAACGGCTC R: CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC	353	60

F forward primer, R reverse primer

siRNA for determining transfection efficiency. Efficiency of both experimental strategies to manipulate the expression levels of each Na<sub>v</sub>β was evaluated by RT-PCR and western blot (see Additional file 1).

### Electrophysiology

Detailed methods for whole-cell patch-clamp recordings and protocols have been previously described [14, 30]. Sodium currents of native or transiently transfected CeCa cells were recorded at room temperature (20–23 °C) using an Axopatch 200B amplifier, a Digi-data 1320A/D converter, and the pCLAMP 10.0 software (Molecular Devices; Sunnyvale, CA). As a positive control for sodium currents, we used transiently transfected CeCa cells with the Na<sub>v</sub>1.6 channel.

### Standard PCR (RT-PCR)

The Na<sub>v</sub>βs mRNA expression levels of CeCa cell lines were assessed by RT-PCR with specific primers for each β-subunit and β-actin as control (Table 1) as described before [30]. Briefly, total RNA of each cell line was isolated with Trizol reagent (Invitrogen; Carlsbad, CA) and RT-PCR reactions were performed in a final volume of 25 μl using the Super-Script One-step RT-PCR kit (Invitrogen) with 250 ng of total RNA, 0.5 μl of enzyme mix, 0.2–0.5 μM of each primer, and 12.5 μl of 2X buffer containing 0.4 mM of each dNTP and 2.4 mM MgSO<sub>4</sub>.

### Real-time PCR (qPCR)

Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen; Hilden, Germany), then reverse-transcribed with the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems; Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions using 2 μg of total RNA in a final volume of 20 μl. Real-time PCR was carried out in a Rotor-Gene Q (Qiagen) using Custom TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) as described before [14]. Briefly, 100 ng of cDNA, 0.4 μl of the TaqMan

**Table 2 qPCR primers information**

mRNA	GenBank access	Primer pair sequence (5' → 3')	PCR product (bp)
Na <sub>v</sub> β1	NM_001037	F: GGAGGATGAGCGCTTCGA R: CAGATCCTGCAGGTCTTTGGT P: CCCC GGCTGCCATT	70
Na <sub>v</sub> β2	NM_004588	F: TGCAGCCGGAGGATGAG R: GAGGACCTGCAGATGGATCTTG P: CCCCTGACCCGCCCG	92
Na <sub>v</sub> β3	NM_018400	F: CGCCAGCCCCAGAAGAT R: CACAGGGAAGCAGACACTGA P: TTTCCCCTGGCTTCTC	90
Na <sub>v</sub> β4	NM_174934	F: AAGAAGTGGACAACACAG TGACA R: TGAGTTTCTTGATCAGCAGGA TGAG P: ACCCCGCCACGACAG	93

F forward primer, R reverse primer, P TaqMan probe

assay (Table 2) and 5 μl of TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) were mixed in a final reaction volume of 10 μl for each qPCR reaction. At least three independent experiments were done, and each assay was performed in triplicate. The results were analyzed by the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method [31] using HPRT1 expression as the normalizing gene control and results are shown as relative expression values of Na<sub>v</sub>β1 in HeLa cells.

### Western blot

Total protein from native or transiently transfected CeCa cells was extracted 24, 48, 72 and 96 h post-transfection (with cDNA or siRNAs, for overexpression or inhibition of the Na<sub>v</sub>β expression respectively) using RIPA buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1% IGEPAL; 1% Sodium deoxycholate, and 1% SDS) supplemented with complete EDTA-free protease inhibitors (Roche, Switzerland), and quantified by Bradford assay. Equal amounts of protein (100 μg) were subjected to

SDS-PAGE, transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, Billerica MA) and probed overnight with the following primary antibodies: rabbit anti- $\text{Na}_V\beta 1$  (1:3000; LifeSpan BioSciences Inc.; Seattle, WA); rabbit anti- $\text{Na}_V\beta 2$  (1:1000; LifeSpan BioSciences Inc.); rabbit anti- $\text{Na}_V\beta 3$  (1:5000; Abcam; Cambridge, UK), rabbit anti- $\text{Na}_V\beta 4$  (1:3000; Novus Biologicals; Littleton, CO) and a homemade mouse anti- $\beta$ -actin antibody (1:1000) used as a loading control. Blots were subsequently probed with an anti-rabbit or an anti-mouse (as the case may be) secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase (1:10,000; Santa Cruz Biotechnology; Dallas, TX) for 1 h at room temperature and visualized using the SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (Thermo Fisher Scientific). Signal intensity of immunoblots was calculated with ImageJ software.

### Proliferation assays

Cell proliferation was determined using the colorimetric 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Briefly, cells were plated in 48-well microplates at an initial density of  $2 \times 10^3$  cells per well. To measure cell proliferation at 24, 48, 72 and 96 h after seeding, 10  $\mu\text{l}$  of MTT solution (5 mg/ml) were added in each well after replacing the culture medium with 200  $\mu\text{l}$  of fresh culture medium. The cells were incubated at 37 °C, and 3 h later, cell culture and MTT solution were removed and 150  $\mu\text{l}$  of dimethyl sulfoxide was added into the plate to dissolve formazan crystals. The absorbance at a wavelength of 562 nm was recorded using an Eppendorf AG 22331 Biophotometer (Eppendorf; Hamburg, Germany). For analyzing the role of  $\text{Na}_V\beta$ s on proliferation, after overnight incubation, cells were transfected with the respective cDNA to overexpress or the specific siRNA to downregulate each  $\beta$ -subunit expression, and finally, MTT assay was performed 24, 48, 72 and 96 h after transfection.

### Cell cycle analysis by flow cytometry

The role of  $\text{Na}_V\beta 1$  on cell cycle in SiHa cells was assessed by flow cytometry after staining the cells with propidium iodide (PI; Molecular Probes, Life Technologies; Grand Island, NY). Briefly,  $2 \times 10^5$  cells were seeded onto 12-well plates, incubated in normal conditions for 24 h, synchronized by serum-reduced conditions (0.2% FBS) for 48 h and then transfected with the specific cDNA or siRNA. After incubating for 48 h, cells were collected and fixed with ice-cold 70% ethanol, stored for at least 24 h at -20 °C, treated with RNase and stained with PI for 1 h at 37 °C. For each condition,  $2 \times 10^4$  cells (singlets) were analyzed in an Accuri C6 cytometer (BD Biosciences; San Jose, CA), and the percentages of cells in each cell cycle phase were analyzed with FlowJo software (Tree Star;

Ashland, OR) using the Dean-Jett-Fox algorithm by three independent tests for each condition. Appropriate gating was used to select the single cell population and used on all samples.

### In vitro migration and invasion assays

Migration and invasion assays were done using culture inserts with 8- $\mu\text{m}$  pore size membranes covered or not with Matrigel (Corning Inc., Corning, NY) for invasion and migration respectively. The upper compartment was seeded with  $5 \times 10^4$  for migration and  $1 \times 10^5$  cells for invasion in DMEM supplemented with 5% FBS, and the lower compartment was filled with DMEM supplemented with 15% FBS as a chemoattractant. The number of cells migrating or invading (according to the circumstances) over 48 h at 37 °C was evaluated using the MTT assay described before. Results were compiled as the mean of at least three repeats, each time done by duplicate, and compared with control conditions.

### In silico immunohistochemistry (IHC) staining analysis

Expression of  $\text{Na}_V\beta 4$  in CeCa and normal cervical tissues was examined using the Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>) [32, 33], a Swedish-based online tool for human protein expression analysis. Representative CeCa and normal tissues cores were chosen for illustrative purposes.

### Statistical analysis

All quantitative results are given as the mean  $\pm$  S.D. Differences in means were tested with an unpaired two-tailed Student's *t* test.

## Results

### Cervical cancer cell lines do not express plasma-membrane voltage-gated sodium currents

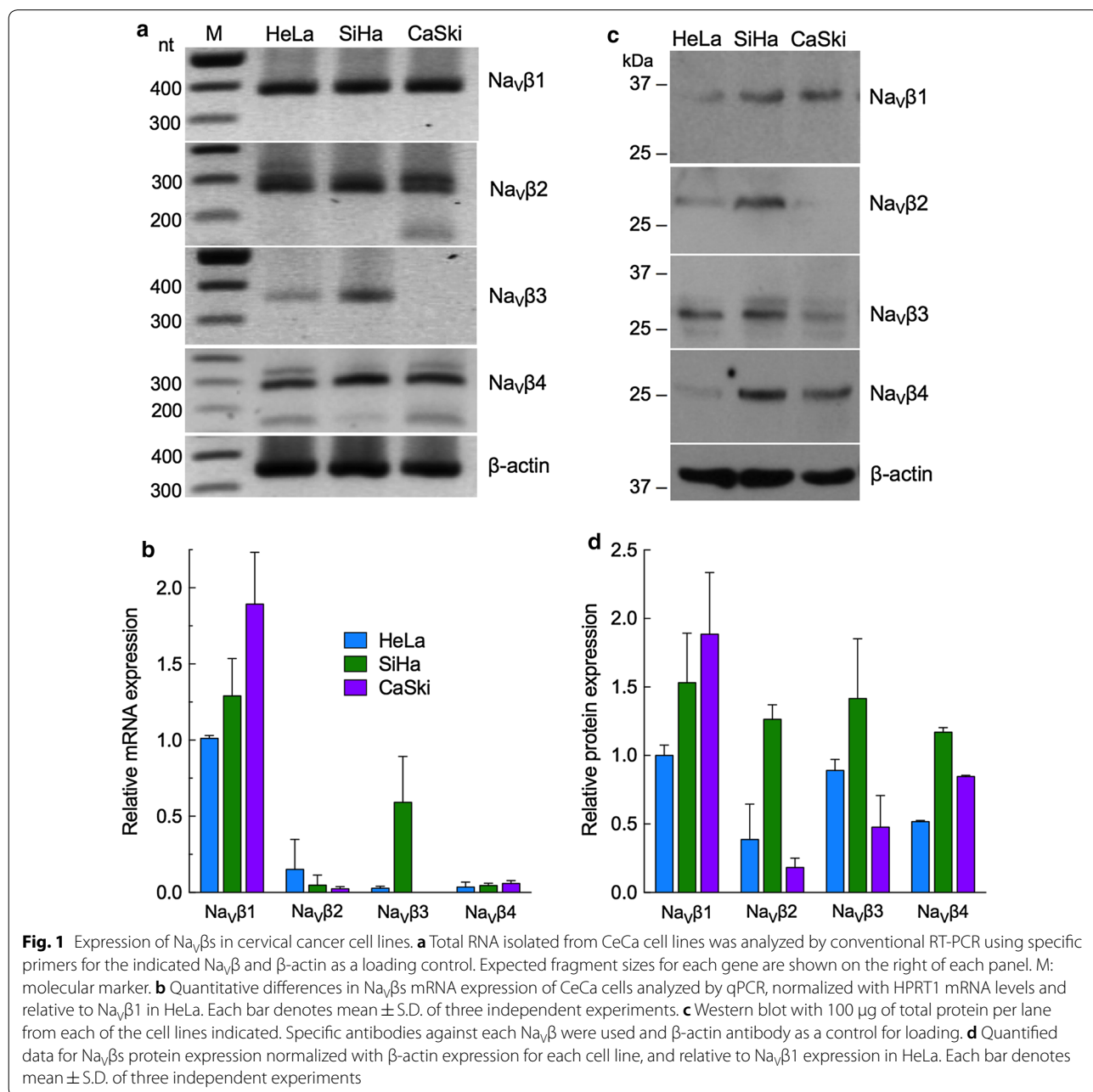
Our previous results showed the functional expression of  $\text{Na}_V$  channels in CeCa primary cultures and specifically demonstrated the relevance of the  $\text{Na}_V 1.6$  channel in the invasiveness of cervical cancer [14, 30]. Thus, in order to further investigate the role of  $\text{Na}_V$  channels in the biology of CeCa, we intended to use CeCa cell lines for such experiments. However, we found that SiHa, CaSki and HeLa cell lines do not express functional  $\text{Na}_V$  channels at the plasma-membrane as determined by whole-cell patch-clamp experiments. ( $n = 30$  cells total; see Additional file 2), even though we have previously shown that they do express the  $\text{Na}_V 1.6$  mRNA and at least one isoform of the  $\text{Na}_V 1.6$  protein [34].



### Endogenous expression of Na<sub>v</sub>βs in cervical cancer cell lines

In previous studies, we described the role of Na<sub>v</sub> α-subunits in the invasive potential of CeCa primary cultures. In this work, we wanted to analyze the possible role of Na<sub>v</sub>βs in different CeCa cellular processes. To that end, endogenous expression of Na<sub>v</sub>βs was first evaluated by RT-PCR using specific primers for each subunit. In most of cases, the mRNA was abundant as evidenced by the generation of the expected amplicon for each β-subunit

(Fig. 1a), suggesting the very likely presence of these proteins. Along with the expected bands, additional PCR amplicons were observed when analyzing the expression of Na<sub>v</sub>β2 and Na<sub>v</sub>β4 by RT-PCR (Fig. 1a). The ≈ 150 bp DNA fragment observed in the Na<sub>v</sub>β4 line matches with a splice variant that has been already reported [23], that would produce a highly truncated protein (if translated) with an unknown functionality. The larger non-specific bands in Na<sub>v</sub>β2 and Na<sub>v</sub>β4 RT-PCR do not correspond to any reported variants of such isoforms, and we cannot



rule out the possibility of a non-specific amplification with these primers. A more detailed study is required to analyze the  $\text{Na}_V\beta$ s isoforms expressed in the CeCa cells and their potential function and/or contribution to the cancerous phenotype. Nevertheless, to carry out a more quantitative analysis of the  $\text{Na}_V\beta$ s expression levels in the different CeCa cell lines we performed qPCR experiments. Results exhibited substantial differences in  $\text{Na}_V\beta$ s mRNA expression, but in all cases,  $\text{Na}_V\beta 1$  showed to be highly expressed, whereas  $\text{Na}_V\beta 3$  displayed the lowest expression levels, except in SiHa cells (Fig. 1b). In addition, evaluation of protein expression by western blot for each  $\text{Na}_V\beta$  indicates that the four  $\text{Na}_V\beta$ s are expressed in the three CeCa cell lines (Fig. 1c). Interestingly, SiHa was the only cell line that express very similar levels of all four  $\text{Na}_V\beta$ s (Fig. 1d). Also, SiHa and CaSki cells expressed significantly higher levels of  $\text{Na}_V\beta 1$  and  $\text{Na}_V\beta 4$  than HeLa cells. While  $\text{Na}_V\beta 3$  levels were similar among the CeCa cell lines, and  $\text{Na}_V\beta 2$  was the less expressed except in SiHa cells (Fig. 1d). The western blot results suggest the absence of additional variants of  $\text{Na}_V\beta$ s isoforms, as we only observed the protein of the expected size.

#### Proliferation, migration and invasion of CeCa cell lines under basal conditions

In order to evaluate the metastatic potential of each CeCa cell line, we analyzed three key metastatic behaviors: proliferation, migration and invasiveness in vitro. HeLa cells demonstrated to be the most aggressive cell line as these cells proliferated, migrated and invaded the most, followed by SiHa cells, and CaSki cells (Fig. 2).

#### Increasing or decreasing the expression of $\text{Na}_V\beta$ s is not enough to promote the functional activity of $\alpha$ -subunits in the plasma membrane

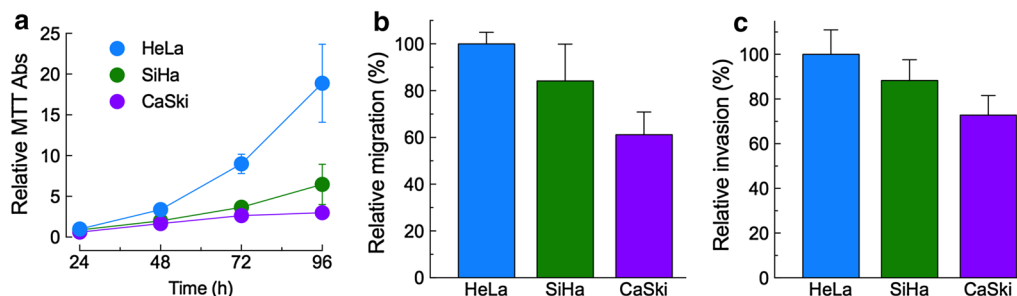
First, to evaluate the siRNA transfection efficacy, we used the siGLO Green Transfection Indicator, a fluorescent

dye attached to a scramble siRNA, and analyzed the cells 24 h later by epifluorescent microscopy. The results indicated that almost 100% of the cells were transfected with the siRNAs, as can be appreciated in Additional file 3. Thus, we followed the same conditions to transfect the specific siRNAs against each of the  $\text{Na}_V\beta$ s.

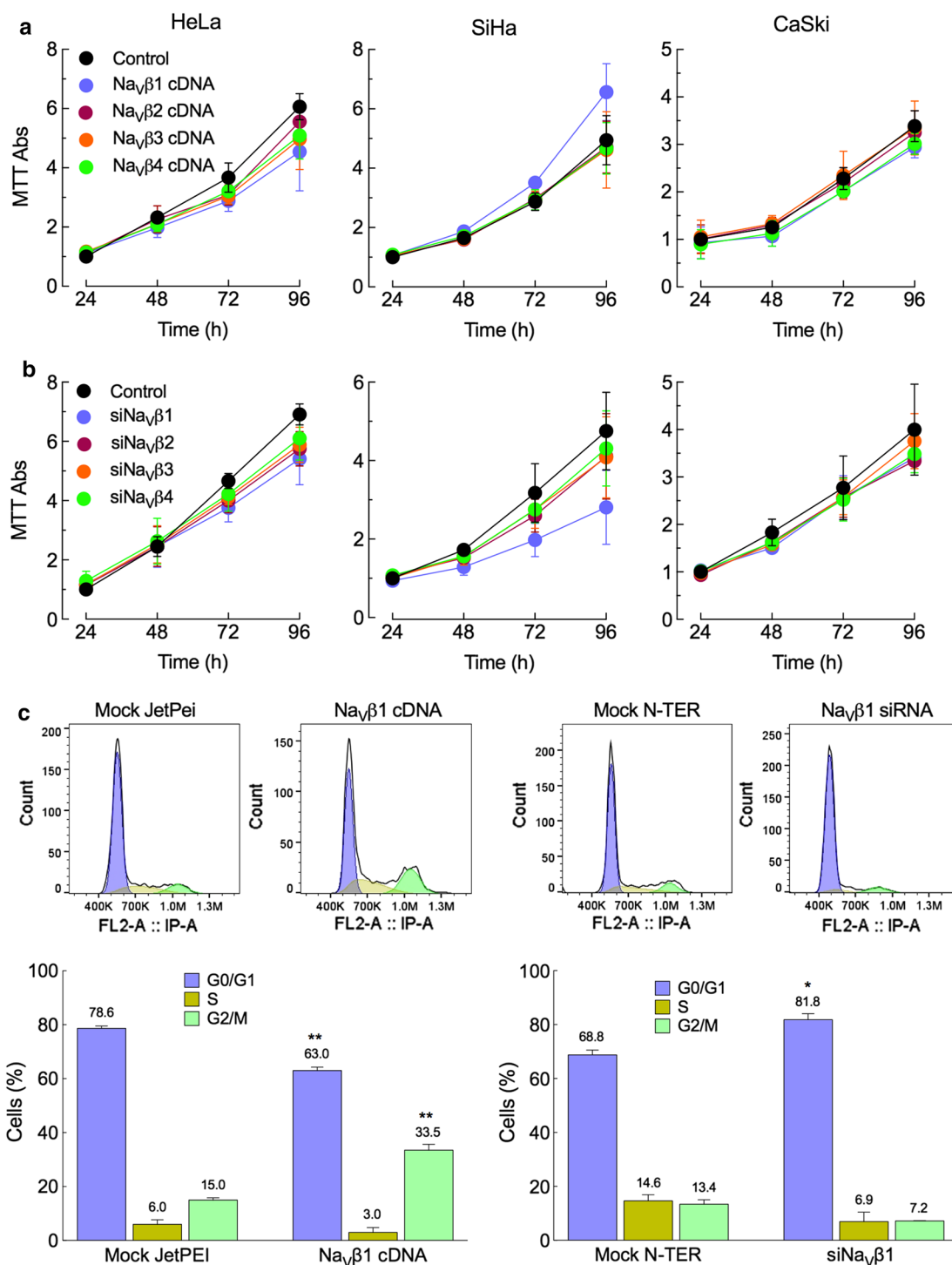
It is well known that some of the  $\text{Na}_V\beta$ s are implicated in the correct trafficking of the  $\text{Na}_V$   $\alpha$ -subunits to the plasma membrane, as has been shown with the heterologous in vitro expression of  $\text{Na}_V\beta 1$  and  $\text{Na}_V\beta 2$  in *Xenopus* oocytes [15, 35], and in vivo with  $\text{Na}_V\beta 2$  knocked-out mice [36]. These evidences made us wonder if the sole overexpression or even the down regulation of the expression of  $\text{Na}_V\beta$ s was enough to promote the functional expression of the pore-forming sodium channels in the plasma membrane and therefore the appearance of voltage-gated sodium currents. To address this question, HeLa and SiHa cells were analyzed by the whole-cell patch-clamp technique 24, 48, 72 and 96 h after transfection to increase or decrease the expression of each of the  $\text{Na}_V\beta$ s. More than 130 cells were successfully investigated with this technique, but we did not find any voltage-gated sodium currents, suggesting that the regulation of the expression of  $\text{Na}_V\beta$ s is not enough to promote the functional activity of  $\text{Na}_V$   $\alpha$ -subunits in the plasma membrane (see Additional file 2).

#### Role of $\text{Na}_V\beta$ s on proliferation

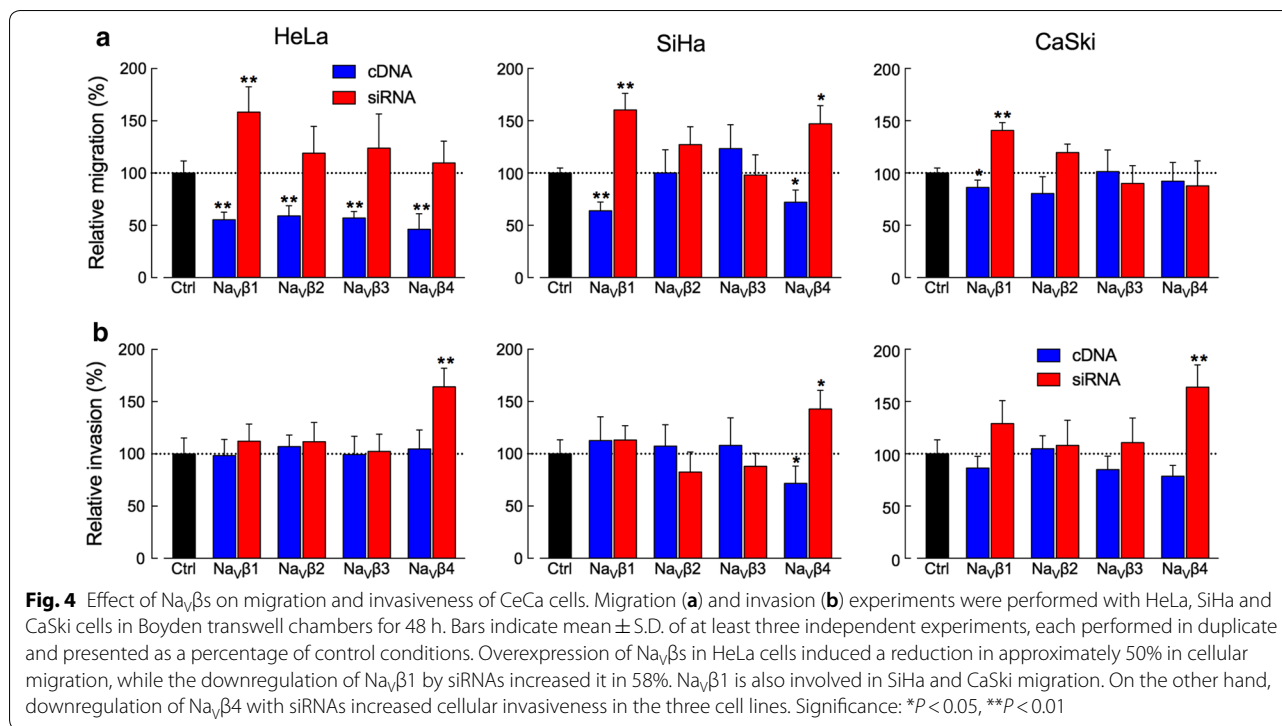
Next, we investigated whether the expression of  $\text{Na}_V\beta$ s had an effect on cell proliferation. This was evaluated in CeCa cell lines 24, 48, 72 and 96 h post-transfection with the cDNA or with the specific siRNA for each  $\text{Na}_V\beta$  subunit to increase or to reduce the expression respectively. Only  $\text{Na}_V\beta 1$  had an effect on proliferation of SiHa cells: the overexpression of  $\text{Na}_V\beta 1$  increased cell proliferation, whereas its downregulation decreased cell duplication (Fig. 3a; center panels). This is similar to what was found



**Fig. 2** Proliferation, migration and invasion of CeCa cells. **a** Proliferation was evaluated by MTT assays 24, 48, 72 and 96 h after seeding the cells ( $2 \times 10^3$  per well). Means  $\pm$  S.D. of three independent experiments, each one done by triplicate. Migration (**b**) and invasion (**c**) of CeCa cells were assessed by Boyden transwell assays for 48 h. Results expressed as percentages of values obtained for HeLa cells. Means  $\pm$  S.D. of three independent experiments, each done by duplicate. HeLa cells showed to be the most aggressive, as they proliferated, migrated and invaded the most



**Fig. 3** Effect of  $Na_v\beta$ s on proliferation and cell-cycle of CeCa cells. Proliferation was evaluated by MTT assays 24, 48, 72 and 96 h post-transfection with plasmids (a) or with specific siRNAs (b) for the  $\beta$ -subunits. The results show the participation of  $Na_v\beta 1$  on proliferation of SiHa cells, as it increases when the protein is overexpressed and decreases when it is downregulated. The other three  $Na_v\beta$ s showed no effect on proliferation of SiHa cells, and none of the  $\beta$ -subunits were involved in proliferation of HeLa and CaSki cells. c Cell cycle analysis by flow cytometry in SiHa cells performed 48 h after transfection of synchronized cells with  $Na_v\beta 1$  cDNA or with the specific siRNA against this subunit. Cells were fixed with ice-cold 70% ethanol, stored for at least 24 h at  $-20^\circ\text{C}$ , treated with RNase and stained with PI for 1 h at  $37^\circ\text{C}$ . For each condition,  $2 \times 10^4$  cells (singlets) were analyzed. Representative histograms of the control mock conditions and the transfected cells (upper panels) of three independent experiments summarized in the bar graphs (bottom panels) as means  $\pm$  S.D. of the relative percentage of cells in each cell cycle phase. Significance: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$



with the breast cancer cell line MDA-MB-231, where the overexpression of  $\text{Na}_V\beta 1$  in these cells led to the development of larger tumors in mice [28]. To corroborate this observation, we decided to perform a cell cycle assay by flow cytometry. First, for standardization purposes, SiHa cells were arrested at the G0/G1 phase by incubation in serum-reduced conditions for 24 and 48 h. To estimate the proportion of cells in different phases of the cell cycle, cells were stained with PI and analyzed by flow cytometry. Results show a consistent arrest of cells when treated for 48 h, as the proportion of the cells in G0/G1 phase increased significantly whereas the percentage of cells in G2/M phase was smaller compared to control (normal medium) conditions (see Additional file 4). Once synchronized cells were transfected with either cDNA or siRNA for  $\text{Na}_V\beta 1$  subunit under the experimental conditions indicated above. Results show a significant increase in the proportion of cells in G2/M phase when overexpressing  $\text{Na}_V\beta 1$  vs the control condition (JetPEI mock control), as well as a significant decrease in the proportion of cells in G0/G1 phase. In the same sense, the downregulation of the expression of  $\text{Na}_V\beta 1$  generated a significantly larger proportion of cells in G0/G1 phase, with no significant changes in the proportion of cells in G2/M phase compared with the N-TER mock control (Fig. 3b). These results suggest a positive role of  $\text{Na}_V\beta 1$  in the proliferation of SiHa cells, but not in HeLa or CaSki cells.

#### Role of $\text{Na}_V\beta$ s on migration and invasion

The role of  $\text{Na}_V\beta$ s on in vitro migration and invasion of CeCa cell lines was evaluated 48 h post-transfection with the cDNA or with the siRNA for each  $\beta$ -subunit to overexpress or to downregulate the expression of  $\text{Na}_V\beta$ s respectively. Migration results show that overexpression of  $\text{Na}_V\beta$ s in HeLa cells induces a significant reduction in migration capability (around 50% in all cases), regardless of the type of  $\text{Na}_V\beta$ , accompanied by a tendency to increase the invasive capability when the  $\text{Na}_V\beta$ s are downregulated, being the effect of the treatment with siRNAs against  $\text{Na}_V\beta 1$  the most substantial (a 58% increment). In SiHa cells, a similar result was found with  $\text{Na}_V\beta 1$  and  $\text{Na}_V\beta 4$ ; a significant reduction on the migration capability (36% and 28% respectively) when they are overexpressed, and an increment (60% and 47% respectively) when they are downregulated, while the manipulation of the expression of  $\text{Na}_V\beta 2$  and  $\text{Na}_V\beta 3$  did not alter the migration of these cells. Finally, in CaSki cells, only  $\text{Na}_V\beta 1$  showed to have a role on cellular migration: the overexpression of this subunit decreased the migration by 14%, whereas the transfection with siRNAs increased it by 41% (Fig. 4a). It is worth of notice that only the effect of  $\text{Na}_V\beta 1$  (negative regulation) in migration remains constant and statistically significant in the three cell lines, suggesting a potential role of  $\text{Na}_V\beta 1$  in CeCa migration capability.

With regards to the *in vitro* invasion, results show that the downregulation of  $\text{Na}_V\beta_4$  increased the invasiveness of the three cell lines: 64% in HeLa, 43% in SiHa and 63% in CaSki cells. Accordingly, the overexpression of this protein induced a reduction on the invasiveness of SiHa and CaSki cells by 28% and 21% respectively, suggesting a potential role of  $\text{Na}_V\beta_4$  as an invasion suppressor. The rest of the  $\text{Na}_V\beta$ s did not significantly modified the invasion capacity of the CeCa cells (Fig. 4b).

Given all these results, we decided to corroborate whereas the diminished expression of  $\text{Na}_V\beta_4$  was associated with the presence of CeCa vs normal cervix tissues. For that purpose, we analyzed *in silico* the expression  $\text{Na}_V\beta_4$  in CeCa biopsies and normal cervical tissues from the Human Protein Atlas. Although the database only has a small number of IHC normal cervix and CeCa biopsies stained for  $\text{Na}_V\beta_4$  ( $n=3$  for normal cervix, and  $n=12$  for cervical cancer), the relationship between the expression of the protein and the presence or absence of cervical cancer is evident: the staining results indicate that three out of three normal cervix tissues have moderate  $\text{Na}_V\beta_4$  expression, while in the CeCa biopsies no signal of  $\text{Na}_V\beta_4$  was detected in twelve out of twelve cases (see Additional file 5). Taken together, these results strongly suggest that  $\text{Na}_V\beta_4$  expression is downregulated in CeCa, leading to an increase in the invasive capacity of the cells, and thus, the metastatic potential.

## Discussion

For many years,  $\text{Na}_V\beta$ s were considered only as “auxiliary”  $\text{Na}_V$  subunits commissioned of regulating the  $\alpha$ -subunit kinetics and cellular localization. Nowadays plenty of evidence shows the multifunctionality of these proteins, participating in a wide variety of cellular processes like cell adhesion, cytoskeleton remodeling, filopodia and invadopodia formation, transcriptional regulation, cell cycle regulation and even apoptosis [21, 29].

For the present work, we chose three different CeCa cell lines in order to cover a wide range of CeCa cases, and to analyze the potential role of  $\text{Na}_V\beta$ s in the malignant behavior of this disease. SiHa and CaSki cells are HPV-16 positive (the most frequently detected viral type in CeCa, found in approximately 57% of cases) whereas HeLa cells arise from a HPV-18 positive tumor (the second most frequent virus; 16% of cases) [37]. Furthermore, HeLa and SiHa cells derived from a primary tumor, while CaSki cells were taken from a metastatic tumor. In addition, the patients' ethnicity and the cellular origins of the three cell lines are different [38–40].

Here we demonstrated the presence (expression) of  $\text{Na}_V\beta$ s in the three different CeCa cell lines (Fig. 1), even in the absence of functional  $\text{Na}_V$   $\alpha$ -subunit expression in

the plasma membrane (evidenced by whole-cell patch-clamp recordings, see Additional file 2), suggesting that their role in cancer cell biology is independent of the pore-forming  $\text{Na}_V$   $\alpha$ -subunit.

When we evaluated the aggressiveness of each cell line, by analyzing the basal proliferation, migration and invasiveness *in vitro*, HeLa cells demonstrated to be the most aggressive cell line, as these cells proliferated, migrated and invaded the most, followed by SiHa cells. CaSki cells were the less proliferative, and they migrated and invaded the less (Fig. 2). As far as we are concerned, this is the first report about the differences in the metastatic behavior among these CeCa cell lines.

We have previously reported the role of  $\text{Na}_V1.6$  (the most overexpressed  $\text{Na}_V$   $\alpha$ -subunit in CeCa biopsies) in the invasiveness potential of CeCa primary cultures [14]. In agreement with our recent findings [34], in the present work we did not find voltage-gated sodium currents in any of the CeCa cell lines studied with the patch-clamp technique. This could be due to at least two possibilities: either the sodium channels are being correctly synthesized but are not reaching the plasma membrane for some unknown reason; or these cells are expressing a non-functional splicing variant. In this regard, it has been reported that  $\text{Na}_V\beta$ s participate in the appropriate traffic and localization of the  $\text{Na}_V$   $\alpha$ -subunits in the plasma membrane [15, 35, 36]. Moreover, it has been shown that  $\text{Na}_V\beta_2$  can be cleaved by secretases, generating small intracellular peptides capable of reaching the cell nucleus and promoting the transcriptional upregulation of genes including *SCN1A*, which encodes for  $\text{Na}_V1.1$  [41, 42]. Hence, we thought that maybe by modifying the expression of these proteins we could promote the functional localization of conducting  $\text{Na}_V$  channels in the plasma membrane, however our results suggest this is not the case, as the manipulation of the expression of the  $\text{Na}_V\beta$ s in HeLa and SiHa cells was not enough to promote the appearance of voltage-dependent sodium currents (see Additional file 2). Yet, there are many other molecules such as hormones and growth factors that could be involved in the correct trafficking of the channel. In fact, we have examined the possibility that  $\text{Na}_V$ s functional expression in CeCa cell lines could be regulated by  $\beta$ -estradiol or EGF, but we did not find sodium currents under any of the experimental conditions tested (data not shown). Another likely explanation could be related to the oxygen conditions in which the cell lines are cultured. It has been reported that hypoxia can change both the expression and activity of  $\text{Na}_V$ s. Tumor cells usually experience severe hypoxia, which has been correlated with a more robust expression and activity of  $\text{Na}_V$ s [43, 44]. On the contrary, CeCa cell lines have been cultured

in normoxic tissue culture conditions, which might have modified the  $\text{Na}_V\alpha$ s expression and/or trafficking.

It is also possible that CeCa cell lines are expressing a non-conducting channel with a different and unknown function and/or localization in the cell. It remains to be investigated whether  $\text{Na}_V\alpha$  subunits are expressed in intracellular compartments, as well as their possible role in invasion. The existence of functional intracellular sodium channels has been demonstrated in macrophages where the activity of this sodium channel contributes to cellular invasion through a mechanism involving sodium ions release from cationic intracellular stores, followed by a subsequent mitochondrial calcium release mediated by the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger, which in turn facilitates cytoskeletal remodeling and invadopodia formation [12]. In fact, recent data from our group suggests the presence of intracellular  $\text{Na}_V1.6$  channels in CeCa cell lines [34]. However, more experiments are needed to fully elucidate this discrepancy between  $\text{Na}_V\alpha$ s functional expression in CeCa primary cultures vs cell lines.

Regarding to the effect of  $\text{Na}_V\beta$ s on cell proliferation, we found that only  $\text{Na}_V\beta1$  had an effect on this process and only in SiHa cells: the overexpression of  $\text{Na}_V\beta1$  increased cell proliferation, whereas the downregulation of the expression of this protein decreased it (Fig. 3a). This is in agreement with observations reported by Nelson et al. [28] demonstrating that  $\text{Na}_V\beta1$  enhances breast tumor growth and metastasis in vivo, by increasing cell proliferation and reducing apoptosis. The fact that we only observed this effect in one out of three CeCa cell lines shows that it is a particularity of the cell line (SiHa) rather than a general role of  $\text{Na}_V\beta1$  on proliferation in cervical cancer.

On the other hand, it has been suggested that  $\text{Na}_V\beta3$  mediates a p53-dependent apoptotic pathway [26]. In breast cancer cells, for example, this subunit is totally absent, although it is normally expressed in non-cancerous breast cells (Sanchez-Sandoval et al., unpublished data). However, the overexpression or down regulation of this subunit did not alter the proliferation rate of the CeCa cell lines analyzed here, suggesting a lack of the pro-apoptotic activity of  $\text{Na}_V\beta3$  in these cells. This might be related to the p53 protein status in CeCa cell lines. It has been reported that the association between the E6 protein (one of the two main HPV oncogenes) with p53 leads to the specific ubiquitination and degradation of p53 protein [45], therefore inactivating any pro-apoptotic effect due to the  $\text{Na}_V\beta3$  expression in basal conditions. This is one of the several ways the HPV genome secures the growing of the tumor. However, the intermediate steps that  $\text{Na}_V\beta3$  must undergo to promote apoptosis is still unknown, as well as why  $\text{Na}_V\beta3$  had no pro-apoptotic effect in CeCa cells when overexpressed. A possible

explanation could be the existence of a positive (and necessary) feedback regulation between p53 (or one of its multiple target genes) and  $\text{Na}_V\beta3$ , leading to a lack of pro-apoptotic activity of  $\text{Na}_V\beta3$  in the absence of functional p53.

On the contrary, our migration experiments show a clear participation (negative regulation) of  $\text{Na}_V\beta1$  on the ability of CeCa cells to perform transwell migration across of an 8  $\mu\text{m}$ -pore membrane. When we induced the overexpression of this subunit, the migration rate decreased in the three CeCa cell lines, being HeLa cells the most affected (almost 50% inhibition in cell migration). Correspondingly, the inhibition of  $\text{Na}_V\beta1$  expression by siRNAs led to significant increments in cell migration of HeLa, SiHa and CaSki cells (Fig. 4a). Thus,  $\text{Na}_V\beta1$  could be acting as a cell adhesion molecule, promoting the cell-cell adhesion and therefore making it difficult to move across the membrane. It is also worth of notice that, among the three cell lines, HeLa have the lowest  $\text{Na}_V\beta1$  expression compared to the other two CeCa cell lines (Fig. 1), and they also have the greatest migration capacity. In the same sense, CaSki cells are the ones with the bigger expression of  $\text{Na}_V\beta1$ , and the lowest migration behavior (Fig. 2b).

A study made on breast cancer cell lines revealed that the overexpression of  $\text{Na}_V\beta1$  in highly metastatic MDA-MB-231 cells increased cell-cell adhesion and decreased in vitro migration, consistent with the proposed role of  $\text{Na}_V\beta1$  as a cell adhesion molecule [27]. However, the *trans*-homophilic interactions through  $\text{Na}_V\beta1$  can also mediate the process outgrowth in vivo, as in neurons, generating an elongated morphology and therefore potentiating metastasis, as has been reported for the same breast cancer cells but using mouse models instead of transwell experiments [28]. Something similar could be happening with CeCa cell lines. Thus, the persistent contribution of  $\text{Na}_V\beta1$  in the three CeCa cell lines migration is indicative of its role as a negative regulator of the in vitro migration, regardless the HPV type present in the CeCa cell line. Although it remains to be investigated whether this behavior also occurs in vivo.

With respect to the contribution of  $\text{Na}_V\beta$ s in invasiveness, our results show that downregulation of  $\text{Na}_V\beta4$  expression resulted in a significant increase in the in vitro invasiveness of the three cell lines studied here (Fig. 4b), suggesting the role of this subunit as a metastasis suppressor protein. These observations agree with the in silico analysis of  $\text{Na}_V\beta4$  expression performed with the Human Protein Atlas data: normal cervix biopsies show moderated  $\text{Na}_V\beta4$  expression, while in CeCa biopsies it seems to be absent (see Additional file 5). Taken together, these results strongly suggest that  $\text{Na}_V\beta4$  expression is downregulated in CeCa, which in turn increases the

invasive capacity of the cells. In accordance with this interpretation, out of the three CeCa cell lines studied in the present work, the HeLa cell line showed the lowest expression of  $\text{Na}_V\beta_4$  and the highest index of cell invasion.

In breast cancer cell lines, it has been found that increasing  $\text{Na}_V\beta_1$  expression promotes the overexpression of  $\text{Na}_V1.5$ , the main  $\text{Na}_V$   $\alpha$ -subunit involved in the invasiveness of this type of cancer [27]. However, according to our results, this is not the case for CeCa cell lines, as the overexpression of  $\text{Na}_V\beta_1$  or  $\text{Na}_V\beta_4$  did not promote the expression of conducting  $\text{Na}_V1.6$  channels in the plasma membrane, the principal  $\text{Na}_V$   $\alpha$ -subunit involved in the invasive potential of these cells. Thus, we conclude that the pathways used by these proteins to induce cell migration and invasion, are independent of the activity of  $\text{Na}_V1.6$  or other  $\text{Na}_V$   $\alpha$ -subunits in the plasma membrane of CeCa cell lines.

Other groups have also reported the downregulation of  $\text{Na}_V\beta_4$  expression in cancer vs normal tissue. This is the case of prostate cancer [23], papillary thyroid cancer [46], and breast cancer [29]. The latter study, performed by the group of Dr. Sebastien Roger at the University of Tours, reported solid evidence about the possible mechanistic pathway through which  $\text{Na}_V\beta_4$  prevents metastasis in cancer cells. They showed an increased activity of the small GTPase RhoA (crucial for cytoskeleton remodeling during migration and invasion) when  $\text{Na}_V\beta_4$  was silenced in breast cancer MDA-MB-231 cells. This effect was independent of  $\text{Na}_V1.5$  channel activity, the main  $\text{Na}_V$   $\alpha$ -subunit implicated in BCa invasiveness. A similar mechanism might be taking place in CeCa cells: a downregulation of the  $\text{Na}_V\beta_4$  subunit that leads to an increased activity of RhoA and therefore, a more robust invasive potential, which is independent of the  $\text{Na}_V1.6$  expression in the plasma membrane. However, we speculate that additional cellular mechanisms might be involved in this phenomenon, as the effects of  $\text{Na}_V\beta_4$  in cellular migration were not significant in our study, meaning that the sole change on cellular motility cannot explain the dramatic increase on cellular invasiveness when  $\text{Na}_V\beta_4$  is downregulated. A more recent study showed that  $\text{Na}_V\beta_4$  is downregulated in papillary thyroid cancer (PTC) compared with normal thyroid tissues. More interestingly, the authors also found that preserved  $\text{Na}_V\beta_4$  expression might independently predict favorable recurrence-free survival in classical PTC [46]. Altogether, these data reinforce the notion of using  $\text{Na}_V\beta_4$  as a biomarker for cancer metastasis and a potential new therapeutic target for the treatment of cervical cancer.

## Conclusions

In conclusion, our results show that even though cervical cancer cell lines do not generate  $\text{Na}_V$  currents, they do express  $\text{Na}_V\beta$  subunits, which could play a role in proliferation ( $\text{Na}_V\beta_1$  only in SiHa cells), migration ( $\text{Na}_V\beta_1$  in the three cell lines), and invasion ( $\text{Na}_V\beta_4$  in the three cell lines studied). The results support the recent knowledge about  $\text{Na}_V\beta$ s as multifunctional proteins involved in cell processes like ion channel regulation, cell adhesion and motility, and even in metastatic cell behaviors. Finally, the evidence presented here contributed to propose  $\text{Na}_V\beta_1$  and  $\text{Na}_V\beta_4$  as prognostic markers for cervical cancer tumor progression.

## Additional files

**Additional file 1.** Evaluation of  $\text{Na}_V\beta$ s expression after transfecting HeLa cells with siRNAs or cDNAs. Real-time PCR and western blot data of  $\text{Na}_V\beta$ s expression in HeLa cells after transfection with corresponding cDNAs or siRNAs.

**Additional file 2.** Analysis of the expression of voltage-gated sodium currents in CeCa cells. Whole-cell patch-clamp experiments performed in CeCa cells to investigate the presence of functional  $\text{Na}_V$   $\alpha$ -subunits in the plasma membrane.

**Additional file 3.** Efficiency of siRNA transfection in CeCa cells. Micrographs of CeCa cells showing the efficiency of siRNA transfection using a fluorescent transfection indicator.

**Additional file 4.** Synchronization of SiHa cells. Flow cytometry results for synchronization of SiHa cells.

**Additional file 5.** Analysis of  $\text{Na}_V\beta_4$  expression in CeCa biopsies and normal cervical tissue. Representative immunohistochemical images of cervical cancer biopsies and normal cervix tissues showing the absence of  $\text{Na}_V\beta_4$  in CeCa biopsies and the moderate expression of the protein in normal cervix.

## Abbreviations

BCa: breast cancer; CAMs: cell adhesion molecules; CeCa: cervical cancer; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium; FBS: fetal bovine serum;  $\text{Na}_V$ : voltage-gated sodium channels;  $\text{Na}_V\beta$ s: voltage-gated sodium channels  $\beta$ -subunits;  $\text{Na}_V1.6$ : voltage-gated sodium channel coded by the *SCN8A*  $\alpha$ -subunit; PI: propidium iodide; PTC: papillary thyroid cancer; qPCR: real-time polymerase chain reaction; RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction.

## Authors' contributions

ALSS conducted all the experiments, analyzed the results, and wrote the original version of the manuscript. JCG conceived the idea for the project, analyzed results and wrote the manuscript with ALSS. Both authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

We are very grateful with Dr. Lori L. Isom for the donation of the four  $\text{Na}_V\beta$ s vectors; and Dr. Laura Ongay, from Unidad de Biología Molecular at Instituto de Fisiología Celular, UNAM, for expert technical support.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

**Availability of data and materials**

All data generated or analyzed during this study are included in this published article [and its additional information files].

**Consent for publication**

Not applicable.

**Ethics approval and consent to participate**

Not applicable.

**Funding**

This work was supported by grants from CONACYT-México (167790-B) and PAPIIT-DGAPA-UNAM (IN206917) to JCG. Ana Laura Sanchez-Sandoval is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship from CONACYT. The funding bodies had no role in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript.

**Publisher's Note**

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 17 October 2018 Accepted: 12 February 2019

Published online: 15 February 2019

**References**

- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(2):87–108.
- Rana MM, Huhtala H, Apter D, Eriksson T, Luostarinen T, Natunen K, et al. Understanding long-term protection of human papillomavirus vaccination against cervical carcinoma: cancer registry-based follow-up. *Int J Cancer J Int du Cancer*. 2013;132(12):2833–8.
- Catterall WA. Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *J Physiol*. 2012;590(Pt 11):2577–89.
- Fraser SP, Diss JK, Chioni AM, Mycielska ME, Pan H, Yamaci RF, et al. Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res*. 2005;11(15):5381–9.
- Brisson L, Gillet L, Calaghan S, Besson P, Le Guennec JY, Roger S, et al. Na(V)1.5 enhances breast cancer cell invasiveness by increasing NHE1-dependent H(+) efflux in caveolae. *Oncogene*. 2011;30(17):2070–6.
- Laniado ME, Lalani EN, Fraser SP, Grimes JA, Bhangal G, Djamgoz MB, et al. Expression and functional analysis of voltage-activated Na<sup>+</sup> channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion in vitro. *Am J Pathol*. 1997;150(4):1213–21.
- Diss JK, Archer SN, Hirano J, Fraser SP, Djamgoz MB. Expression profiles of voltage-gated Na(+) channel alpha-subunit genes in rat and human prostate cancer cell lines. *Prostate*. 2001;48(3):165–78.
- House CD, Vaske CJ, Schwartz AM, Obias V, Frank B, Luu T, et al. Voltage-gated Na<sup>+</sup> channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion. *Cancer Res*. 2010;70(17):6957–67.
- Gao R, Shen Y, Cai J, Lei M, Wang Z. Expression of voltage-gated sodium channel alpha subunit in human ovarian cancer. *Oncol Rep*. 2010;23(5):1293–9.
- Roger S, Rollin J, Barascu A, Besson P, Raynal PI, Lochmann S, et al. Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines. *Int J Biochemis Cell Biol*. 2007;39(4):774–86.
- Xia J, Huang N, Huang H, Sun L, Dong S, Su 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):2553–69.
- Carrithers MD, Chatterjee G, Carrithers LM, Offoha R, Iheagwara U, Rahner C, et al. Regulation of podosome formation in macrophages by a splice variant of the sodium channel SCN8A. *J Biol Chem*. 2009;284(12):8114–26.
- Xing D, Wang J, Ou S, Wang Y, Qiu B, Ding 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):2692–700.
- Hernandez-Plata E, Ortiz CS, Marquina-Castillo B, Medina-Martinez I, Alfaro A, Berumen J, et al. Overexpression of Nav1.6 channels is associated with the invasion capacity of human cervical cancer. *Int J Cancer J Int du Cancer*. 2012;130(9):2013–23.
- Isom LL, Ragsdale DS, De Jongh KS, Westenbroek RE, Reber BF, Scheuer T, et al. Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell*. 1995;83(3):433–42.
- Malhotra JD, Kazen-Gillespie K, Hortsch M, Isom LL. Sodium channel beta subunits mediate homophilic cell adhesion and recruit ankyrin to points of cell-cell contact. *J Biol Chem*. 2000;275(15):11383–8.
- Ratcliffe CF, Westenbroek RE, Curtis R, Catterall WA. Sodium channel beta1 and beta3 subunits associate with neurofascin through their extracellular immunoglobulin-like domain. *J Cell Biol*. 2001;154(2):427–34.
- Malhotra JD, Koopmann MC, Kazen-Gillespie KA, Fettman N, Hortsch M, Isom LL. Structural requirements for interaction of sodium channel beta 1 subunits with ankyrin. *J Biol Chem*. 2002;277(29):26681–8.
- Yu FH, Westenbroek RE, Silos-Santiago I, McCormick KA, Lawson D, Ge P, et al. Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *J Neurosci*. 2003;23(20):7577–85.
- McEwen DP, Isom LL. Heterophilic interactions of sodium channel beta1 subunits with axonal and glial cell adhesion molecules. *J Biol Chem*. 2004;279(50):52744–52.
- Brackebury WJ, Isom LL. Na channel beta subunits: overachievers of the ion channel family. *Front Pharmacol*. 2011;2:53.
- Yerreddi NR, Cusdin FS, Namadurai S, Packman LC, Monie TP, Slavny P, et al. The immunoglobulin domain of the sodium channel beta3 subunit contains a surface-localized disulfide bond that is required for homophilic binding. *FASEB J*. 2013;27(2):568–80.
- Diss JK, Fraser SP, Walker MM, Patel A, Latchman DS, Djamgoz MB. Beta-subunits of voltage-gated sodium channels in human prostate cancer: quantitative in vitro and in vivo analyses of mRNA expression. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2008;11(4):325–33.
- Jansson KH, Lynch JE, Lepori-Bui N, Czymbek KJ, Duncan RL, Sikes RA. Overexpression of the VSSC-associated CAM, beta-2, enhances LNCaP cell metastasis associated behavior. *Prostate*. 2012;72(10):1080–92.
- Jansson KH, Castillo DG, Morris JW, Boggs ME, Czymbek KJ, Adams EL, et al. Identification of beta-2 as a key cell adhesion molecule in PCa cell neurotropic behavior: a novel ex vivo and biophysical approach. *PLoS ONE*. 2014;9(6):e98408.
- Adachi K, Toyota M, Sasaki Y, Yamashita T, Ishida S, Ohe-Toyota M, et al. Identification of SCN3B as a novel p53-inducible proapoptotic gene. *Oncogene*. 2004;23(47):7791–8.
- Chioni AM, Brackebury WJ, Calhoun JD, Isom LL, Djamgoz MB. A novel adhesion molecule in human breast cancer cells: voltage-gated Na<sup>+</sup> channel beta1 subunit. *Int J Biochemis Cell Biol*. 2009;41(5):1216–27.
- Nelson M, Millican-Slater R, Forrest LC, Brackebury WJ. The sodium channel beta1 subunit mediates outgrowth of neurite-like processes on breast cancer cells and promotes tumour growth and metastasis. *Int J Cancer J Int du Cancer*. 2014;135(10):2338–51.
- Bon E, Driffort V, Gradek F, Martinez-Caceres C, Anachelin M, Pelegrin P, et al. SCN4B acts as a metastasis-suppressor gene preventing hyperactivation of cell migration in breast cancer. *Nat Commun*. 2016;7:13648.
- Diaz D, Delgadillo DM, Hernandez-Gallegos E, Ramirez-Dominguez ME, Hinojosa LM, Ortiz CS, et al. Functional expression of voltage-gated sodium channels in primary cultures of human cervical cancer. *J Cell Physiol*. 2007;210(2):469–78.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
- Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015;347(6220):1260419.
- Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, Lundberg E, Jonasson K, Forsberg M, et al. Towards a knowledge-based human protein atlas. *Nat Biotechnol*. 2010;28(12):1248–50.
- Lopez-Charcas O, Espinosa AM, Alfaro A, Herrera-Carrillo Z, Ramirez-Cordero BE, Cortes-Reynosa P, et al. The invasiveness of human cervical cancer associated to the function of Nav1.6 channels is mediated by MMP-2 activity. *Sci Rep*. 2018;8(1):12995.



35. Isom LL, De Jongh KS, Patton DE, Reber BF, Offord J, Charbonneau H, et al. Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science*. 1992;256(5058):839–42.
36. Chen C, Bharucha V, Chen Y, Westenbroek RE, Brown A, Malhotra JD, et al. Reduced sodium channel density, altered voltage dependence of inactivation, and increased susceptibility to seizures in mice lacking sodium channel beta 2-subunits. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(26):17072–7.
37. Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2013;382(9895):889–99.
38. Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Can Res*. 1952;12(4):264–5.
39. Friedl F, Kimura I, Osato T, Ito Y. Studies on a new human cell line (SiHa) derived from carcinoma of uterus. I. Its establishment and morphology. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1970;135(2):543–5.
40. Pattillo RA, Hussa RO, Story MT, Ruckert AC, Shalaby MR, Mattingly RF. Tumor antigen and human chorionic gonadotropin in CaSki cells: a new epidermoid cervical cancer cell line. *Science*. 1977;196(4297):1456–8.
41. Kim DY, Carey BW, Wang HB, Ingano LAM, Binshtok AM, Wertz MH, et al. BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity. *Nat Cell Biol*. 2007;9(7):755–64.
42. Kim DY, Ingano LAM, Carey BW, Pettingell WH, Kovacs DM. Presenilin/gamma-secretase-mediated cleavage of the voltage-gated sodium channel beta 2-subunit regulates cell adhesion and migration. *J Biol Chem*. 2005;280(24):23251–61.
43. Ju YK, Saint DA, Gage PW. Hypoxia increases persistent sodium current in rat ventricular myocytes. *J Physiol-London*. 1996;497(2):337–47.
44. Fearon IM, Brown ST. Acute and chronic hypoxic regulation of recombinant hNa(v)1.5 alpha subunits. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;324(4):1289–95.
45. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*. 1993;75(3):495–505.
46. Gong Y, Yang J, Wu W, Liu F, Su A, Li Z, et al. Preserved SCN4B expression is an independent indicator of favorable recurrence-free survival in classical papillary thyroid cancer. *PLoS ONE*. 2018;13(5):e0197007.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)



RESEARCH ARTICLE

# CDKN3 mRNA as a Biomarker for Survival and Therapeutic Target in Cervical Cancer

Eira Valeria Barrón<sup>1,2</sup>, Edgar Roman-Bassaure<sup>3</sup>, Ana Laura Sánchez-Sandoval<sup>4</sup>, Ana María Espinosa<sup>1</sup>, Mariano Guardado-Estrada<sup>1</sup>, Ingrid Medina<sup>1</sup>, Eligia Juárez<sup>1</sup>, Ana Alfaro<sup>1</sup>, Miriam Bermúdez<sup>1</sup>, Rubén Zamora<sup>5,6</sup>, Carlos García-Ruiz<sup>1</sup>, Juan Carlos Gomora<sup>4</sup>, Susana Kofman<sup>7</sup>, E. Martha Pérez-Armendariz<sup>2\*</sup>, Jaime Berumen<sup>1,2\*</sup>

**1** Unidad de Medicina Genómica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México/Hospital General de México, México City, México, **2** Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México, **3** Servicio de Oncología, Hospital General de México, México City, México, **4** Departamento de Neuropatología Molecular, División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México, **5** Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México, **6** Laboratorio de Biología Molecular, Asociación para Evitar la Ceguera en México Hospital Dr. Luis Sánchez-Bulnes, México City, México, **7** Servicio de Genética, Hospital General de México/Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México

\* Current address: Departamento de Biología, Celular y Tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México

\* [jaimeberumen@hotmail.com](mailto:jaimeberumen@hotmail.com)



CrossMark  
click for updates

**OPEN ACCESS**

**Citation:** Barrón EV, Roman-Bassaure E, Sánchez-Sandoval AL, Espinosa AM, Guardado-Estrada M, Medina I, et al. (2015) *CDKN3* mRNA as a Biomarker for Survival and Therapeutic Target in Cervical Cancer. PLoS ONE 10(9): e0137397. doi:10.1371/journal.pone.0137397

**Editor:** Zhi-Ming Zheng, National Institute of Health—National Cancer Institute, UNITED STATES

**Received:** December 18, 2014

**Accepted:** August 17, 2015

**Published:** September 15, 2015

**Copyright:** © 2015 Barrón et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by the National Council of Science and Technology (CONACYT, [www.conacyt.mx](http://www.conacyt.mx)), grant numbers 8135/A1, 24341 (to JB), National University of Mexico ([www.unam.mx](http://www.unam.mx)), grant number SDI.PTID.05.2 (to JB), and National Council of Science and Technology (CONACYT, [www.conacyt.mx](http://www.conacyt.mx)), scholarship (to EVB). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Abstract

The cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (*CDKN3*) gene, involved in mitosis, is upregulated in cervical cancer (CC). We investigated *CDKN3* mRNA as a survival biomarker and potential therapeutic target for CC. *CDKN3* mRNA was measured in 134 CC and 25 controls by quantitative PCR. A 5-year survival study was conducted in 121 of these CC patients. Furthermore, *CDKN3*-specific siRNAs were used to investigate whether *CDKN3* is involved in proliferation, migration, and invasion in CC-derived cell lines (SiHa, CaSki, HeLa). *CDKN3* mRNA was on average 6.4-fold higher in tumors than in controls ( $p = 8 \times 10^{-6}$ , Mann-Whitney). A total of 68.2% of CC patients over expressing *CDKN3* gene (fold change  $\geq 17$ ) died within two years of diagnosis, independent of the clinical stage and HPV type (Hazard Ratio = 5.0, 95% CI: 2.5–10,  $p = 3.3 \times 10^{-6}$ , Cox proportional-hazards regression). In contrast, only 19.2% of the patients with lower *CDKN3* expression died in the same period. In vitro inactivation of *CDKN3* decreased cell proliferation on average 67%, although it had no effect on cell migration and invasion. *CDKN3* mRNA may be a good survival biomarker and potential therapeutic target in CC.

## Introduction

Cervical cancer (CC) is the fourth most common cancer in women worldwide [1]. Each year 530,000 new cases are reported, making it the leading cause of death by cancer in women from developing countries [2, 3]. Human papillomavirus (HPV) is present in almost 100% of CCs



Cite this: *New J. Chem.*, 2018, 42, 3878

## Anticarcinogenic and metal chelation properties of novel hydroxybenzylidene-1-indanone derivatives in the U-251 glioblastoma cell line†

Mariana Lozano-Gonzalez,<sup>id</sup>\*<sup>ab</sup> María Teresa Ramírez-Apan,<sup>c</sup> Antonio Nieto-Camacho,<sup>c</sup> Ruben Alfredo Toscano,<sup>c</sup> Ana Laura Sanchez-Sandoval<sup>d</sup> and Cecilio Alvarez-Toledano\*<sup>c</sup>

A novel series of (*Z*)-2-(hydroxy(aryl)methylene)-2,3-dihydro-1*H*-indanone derivatives were designed, synthesized and evaluated as cytotoxic agents against six cancer cell lines. *In vitro* studies showed that most of the molecules exhibited significant activity and selectivity towards the U-251 glioblastoma cell line, especially compounds **1** and **4**, which were shown to have a lower IC<sub>50</sub> value than that of temozolomide (TMZ) and promoted apoptosis in these cells. The compounds were also shown to be metal chelators, particularly iron chelators (Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>0</sup> and Fe<sup>3+</sup>) that form iron(III) complexes, an important anticancer property. Compounds **8a** and **1b**, in particular, formed complexes with an IC<sub>50</sub> value markedly lower than that of TMZ and showed pro-apoptotic activity. Basic structure–activity relationship analysis indicated that the skeleton base of 1-indanone and the aryl group are coplanar, and that the electron-donating methoxy moiety was responsible for the selective cytotoxic response.

Received 3rd November 2017,  
Accepted 14th December 2017

DOI: 10.1039/c7nj04266c

rsc.li/njc

### Introduction

Several natural products contain indanones that exhibit biological activities including cytotoxic, antibacterial and anti-hypertensive properties, such as **1**, isolated from the fruit of *Virola sebifera*.<sup>1</sup> However, the study of these compounds focuses on two pathologies: Alzheimer's disease (AD) and cancer. For example, **2** (Fig. 1) acts as an acetylcholinesterase inhibitor and is approved by the Food and Drug Administration for the treatment of mild to moderate AD.<sup>2</sup> Indanocine (**3**) has been identified by the Developmental Therapeutics Program of the National Cancer Institute as an antiproliferative, cytotoxic and cytostatic compound (Fig. 1).<sup>3</sup> Several studies have demonstrated the important biological activities of compounds with an indanone skeleton, some of which can cross the haematoencephalic barrier, an essential property for the

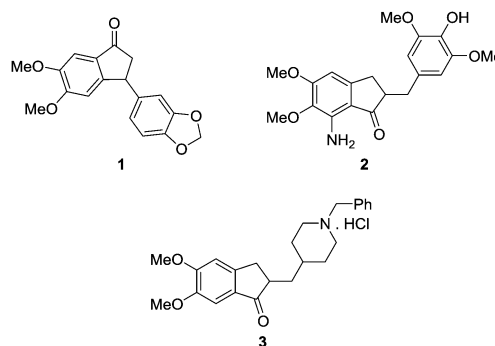


Fig. 1 Indanone derivatives with important biological activities.

treatment of AD and brain cancers such as glioblastoma and neuroblastoma.<sup>2,4,5</sup>

Gliomas account for the majority of malignant brain tumours in adults, comprising approximately 30% of all brain and central nervous system tumours and 80% of all malignant brain tumours, and are among the most challenging cancers to treat, primarily because their aetiology remains largely unknown.<sup>6,7</sup>

Temozolomide (TMZ) is the most widely used chemotherapy drug against glioma, despite its adverse side effects, limited drug delivery, and persistent chemoresistance, similar to many other anticancer agents.<sup>8</sup> Therefore, a significant need exists to develop novel anticancer drugs for the treatment of this malignancy.

<sup>a</sup> Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior S/N, Coyoacán, Cd. Universitaria, 04510 Ciudad de México, CDMX, Mexico. E-mail: lozbat89@hotmail.com

<sup>b</sup> Universidad Tecnológica de México, Ermita Iztapalapa 557, Col. Granjas Esmeralda, 09810 CDMX, Mexico

<sup>c</sup> Instituto de Química, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México 04360 CDMX, Mexico. E-mail: cecilio@unam.mx

<sup>d</sup> Instituto de Fisiología Celular, Cto. Exterior s/n, Cd. Universitaria, 04510 Ciudad de México, Mexico

† Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental section characterization and spectroscopic data and copies of the, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR of all the products. CCDC 1583890 and 1583891. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c7nj04266c

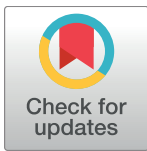
RESEARCH ARTICLE

# Contribution of S4 segments and S4-S5 linkers to the low-voltage activation properties of T-type $Ca_v3.3$ channels

Ana Laura Sanchez-Sandoval<sup>1</sup>, Zazil Herrera Carrillo<sup>1</sup>, Clara Estela Díaz Velásquez<sup>2</sup>, Dulce María Delgadillo<sup>3</sup>, Heriberto Manuel Rivera<sup>4</sup>, Juan Carlos Gomora<sup>1\*</sup>

**1** Departamento de Neuropatología Molecular, División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México Mexico City, México, **2** Programa de Neurociencias, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepanitla de Baz, Estado de México, México, **3** Laboratorios Nacionales de Servicios Experimentales Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, México, **4** Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos Cuernavaca, Morelos, México

\* [jgomora@ifc.unam.mx](mailto:jgomora@ifc.unam.mx)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Sanchez-Sandoval AL, Herrera Carrillo Z, Díaz Velásquez CE, Delgadillo DM, Rivera HM, Gomora JC (2018) Contribution of S4 segments and S4-S5 linkers to the low-voltage activation properties of T-type  $Ca_v3.3$  channels. PLoS ONE 13(2): e0193490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193490>

**Editor:** Alexander G. Obukhov, Indiana University School of Medicine, UNITED STATES

**Received:** July 25, 2017

**Accepted:** February 12, 2018

**Published:** February 23, 2018

**Copyright:** © 2018 Sanchez-Sandoval et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This study was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-México, grant number 167790-B to JCG, <https://www.conacyt.gob.mx/>; Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), Universidad Nacional Autónoma de México, grant number IN207614 to JCG, <http://dgapa.unam.mx/>

## Abstract

Voltage-gated calcium channels contain four highly conserved transmembrane helices known as S4 segments that exhibit a positively charged residue every third position, and play the role of voltage sensing. Nonetheless, the activation range between high-voltage (HVA) and low-voltage (LVA) activated calcium channels is around 30–40 mV apart, despite the high level of amino acid similarity within their S4 segments. To investigate the contribution of S4 voltage sensors for the low-voltage activation characteristics of  $Ca_v3.3$  channels we constructed chimeras by swapping S4 segments between this LVA channel and the HVA  $Ca_v1.2$  channel. The substitution of S4 segment of Domain II in  $Ca_v3.3$  by that of  $Ca_v1.2$  (chimera IIS4C) induced a ~35 mV shift in the voltage-dependence of activation towards positive potentials, showing an *I-V* curve that almost overlaps with that of  $Ca_v1.2$  channel. This HVA behavior induced by IIS4C chimera was accompanied by a 2-fold decrease in the voltage-dependence of channel gating. The IVS4 segment had also a strong effect in the voltage sensing of activation, while substitution of segments IS4 and IIS4 moved the activation curve of  $Ca_v3.3$  to more negative potentials. Swapping of IIS4 voltage sensor influenced additional properties of this channel such as steady-state inactivation, current decay, and deactivation. Notably, Domain I voltage sensor played a major role in preventing  $Ca_v3.3$  channels to inactivate from closed states at extreme hyperpolarized potentials. Finally, site-directed mutagenesis in the  $Ca_v3.3$  channel revealed a partial contribution of the S4-S5 linker of Domain II to LVA behavior, with synergic effects observed in double and triple mutations. These findings indicate that IIS4 and, to a lesser degree IVS4, voltage sensors are crucial in determining the LVA properties of  $Ca_v3.3$  channels, although the accomplishment of this function involves the participation of other structural elements like S4-S5 linkers.

RESEARCH NOTE

Open Access



# Increase of $Ca_v3$ channel activity induced by HVA $\beta1b$ -subunit is not mediated by a physical interaction

Rogelio Arteaga-Tlecuil<sup>1</sup>, Ana Laura Sanchez-Sandoval<sup>1</sup>, Belen Ernestina Ramirez-Cordero<sup>1</sup>, Margarita Jacaranda Rosendo-Pineda<sup>2</sup>, Luis Vaca<sup>2</sup> and Juan Carlos Gomora<sup>1\*</sup> 

## Abstract

**Objective:** Low voltage-activated (LVA) calcium channels are crucial for regulating oscillatory behavior in several types of neurons and other excitable cells. LVA channels dysfunction has been implicated in epilepsy, neuropathic pain, cancer, among other diseases. Unlike for High Voltage-Activated (HVA) channels, voltage-dependence and kinetics of currents carried by recombinant LVA, i.e.,  $Ca_v3$  channels, are quite similar to those observed in native currents. Therefore, whether these channels are regulated by HVA auxiliary subunits, remain controversial. Here, we used the  $\alpha1$ -subunits of  $Ca_v3.1$ ,  $Ca_v3.2$ , and  $Ca_v3.3$  channels, together with HVA auxiliary  $\beta$ -subunits to perform electrophysiological, confocal microscopy and immunoprecipitation experiments, in order to further explore this possibility.

**Results:** Functional expression of  $Ca_v3$  channels is up-regulated by all four  $\beta$ -subunits, although most consistent effects were observed with the  $\beta1b$ -subunit. The biophysical properties of  $Ca_v3$  channels were not modified by any  $\beta$ -subunit. Furthermore, although  $\beta1b$ -subunits increased colocalization of GFP-tagged  $Ca_v3$  channels and the plasma membrane of HEK-293 cells, western blots analysis revealed the absence of physical interaction between  $Ca_v3.3$  and  $\beta1b$ -subunits as no co-immunoprecipitation was observed. These results provide solid evidence that the up-regulation of LVA channels in the presence of HVA- $\beta1b$  subunit is not mediated by a high affinity interaction between both proteins.

**Keywords:** Voltage-gated calcium channel,  $Ca_v3$  channel, Electrophysiology,  $\beta$ -Subunit, Protein-protein interaction, Fluorescence, Colocalization, FRET

## Introduction

Voltage-gated calcium ( $Ca_v$ ) channels play a crucial role in cell  $Ca^{2+}$  influx, which in turn influences several cell functions as cellular excitability, muscle contraction, hormone and neurotransmitter secretion, and gene expression [1]. The  $Ca_v$  channels family is classified in low- and high-voltage activated (LVA and HVA) channels based on their activation threshold [2]. The conduction pore of these channels is formed by the  $\alpha1$ -subunit, a four homologous domains (I–IV) single protein [3]. Auxiliary

subunits, named  $\beta$ ,  $\alpha2\delta$  and  $\gamma$ , modulate the activity of HVA channels [4, 5]. In particular,  $\beta$ -subunits, modulate HVA channels by increasing their surface expression [6–9], and modifying the voltage-dependence and current kinetics [reviewed by Refs. 4, 6].  $\alpha1$ - and  $\beta$ -subunits interaction takes place through the AID (alpha interaction domain) motif, localized at the intracellular link between domain I and II of  $\alpha1$ -subunits, and the alpha-binding pocket (ABP) site of  $\beta$ -subunits; this is a high-affinity interaction ranging from 2 to 54 nM [10–12]. In addition, low-affinity interaction sites at the amino and carboxy termini of HVA channels have also been implicated [13–16]. In contrast, it has been suggested that LVA channels (also known as T-type or  $Ca_v3$  channels), are not modulated by HVA auxiliary subunits [17–19].

\*Correspondence: jgomora@ifc.unam.mx

<sup>1</sup> Departamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article

