



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Participación de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A* en el cáncer cervicouterino”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Lic. Deborah de la Caridad Delgado Herrera

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 Universitaria, CD. MX. Junio, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



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: **Dra. Marcela Lizano Soberón**

VOCAL: **Dra. Ana Victoria Vega Salcedo**

VOCAL: **Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez**

VOCAL: **Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo**

SECRETARIO: **Dra. Myrian Velasco Torres**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Departamento de Neuropatología Molecular, Laboratorio BL-203,

Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

ASESOR:

Dr. Juan Carlos Gómora Martínez

SUSTENTANTE:

Lic. Deborah de la Caridad Delgado Herrera

RECONOCIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitir mi superación profesional.

Al Dr. Juan Carlos Gómora Martínez, por aceptarme en su grupo de investigación y enseñarme gran parte de lo que sé hoy. Gracias por su infinita paciencia y consagrada dedicación a la superación de sus alumnos. ¡Es un valioso ejemplo que seguir!

A la Dra. Leticia Rocha Zavaleta y a la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia, por fungir como excelentes miembros de mi Comité Tutor. Por todas sus recomendaciones y observaciones al presente estudio. Gracias por tanta amabilidad.

A la Dra. Ana Laura Sánchez Sandoval, por todas sus orientaciones iniciales para el comienzo de este proyecto.

Al Dr. Everardo Hernández Plata, por el apoyo técnico en el laboratorio durante la primera parte de este proyecto.

Al Dr. Miguel Ramírez Aragón, por el apoyo técnico brindado durante gran parte del desarrollo de este proyecto. Por su incondicional ayuda, su amabilidad y su empatía, muchas gracias.

Se reconoce el apoyo brindado por la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por brindarnos el apoyo técnico en los experimentos de secuenciación automática.

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

Durante los dos años de estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT. En el quinto semestre de la maestría, gocé de una beca brindada por PAPIIT, por parte de la DGAPA, UNAM (IN209820)

El proyecto fue apoyado por CONACYT con el donativo A1-S-19171.

A mí abuela y a mí mamá ...

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Epidemiología del cáncer cervicouterino (CaCu)	3
1.1.1 Incidencia y mortalidad del CaCu a nivel mundial	3
1.1.2 Incidencia y mortalidad del CaCu en México.....	4
1.2 Canales iónicos activados por voltaje	6
1.2.1 Los canales iónicos activados por voltaje y el cáncer	6
1.2.2 Estructura molecular e isoformas de los canales Na_v	8
1.2.3 Contribución de los canales Na_v a la capacidad metastásica de las células cancerígenas	11
2. ANTECEDENTES DIRECTOS	13
3. HIPÓTESIS.....	17
4. OBJETIVOS GENERALES	17
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS	18
5.1 Cultivos de líneas celulares de CaCu.....	18
5.2 Transfección de células HEK-293 ordinarias con el plásmido H41.....	19
5.3 Extracción de RNA total	20
5.4 RT-PCR estándar	20
5.5 PCR en tiempo real (qPCR).....	22
5.5.1 Rangos Dinámicos	22
5.5.2 Cuantificación de los niveles de expresión de las variantes del exón 18 del gen <i>SCN8A</i>.....	24
5.6 Subclonación de los productos de qPCR.....	25
6. RESULTADOS	27
6.1 Estudio de rangos dinámicos para las sondas <i>Custom TaqMan</i>[®] de las variantes del exón 18 del gen <i>SCN8A</i>.....	27
6.2 Caracterización de la identidad molecular de los productos de qPCR de las variantes del exón 18 del gen <i>SCN8A</i>.....	30
6.3 Análisis cuantitativo de los niveles de expresión del mRNA de las variantes del exón 18 del gen <i>SCN8A</i> en líneas celulares de CaCu.....	40
7. DISCUSIÓN.....	50
7.1 Expresión de variantes del exón 18 del gen <i>SCN8A</i> en líneas celulares de CaCu: caracterización molecular.....	51
7.2 Expresión de variantes del exón 18 del gen <i>SCN8A</i> en líneas celulares de CaCu: niveles diferenciales de mRNA.....	54
7.3 Expresión de variantes del exón 18 del gen <i>SCN8A</i> en líneas celulares de CaCu: contribución a la capacidad metastásica.....	56
8. CONCLUSIONES	58
9. PERSPECTIVAS	59
10. REFERENCIAS	60

RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es el cuarto cáncer femenino más frecuente alrededor del mundo con más de 600 mil casos nuevos y alrededor de 341 mil muertes en el año 2020, ubicándose como la segunda causa de muerte relacionada con cáncer en mujeres en países en vías de desarrollo. Los canales de sodio activados por voltaje (canales Nav) han sido canónicamente relacionados con la generación y propagación de potenciales de acción en células excitables. Sin embargo, más recientemente algunos estudios han demostrado que los canales Nav se expresan funcionalmente en varios tipos de cáncer epitelial, tales como: mama, colon, gástrico, pulmón, próstata, ovario y cervicouterino. En particular, en el CaCu, la subunidad α que constituye el canal Nav1.6 se sobre expresa específicamente respecto al tejido cervical no canceroso y tiene una contribución directa a la capacidad de invasión de las células cancerígenas. El gen *SCN8A*, el cual codifica la subunidad α del canal Nav1.6, genera tres variantes distintas debido al procesamiento alternativo que sufre el exón 18. La primera variante es aquella que contiene la longitud completa del exón y se denomina variante adulta (18A), la cual se expresa funcionalmente en la membrana plasmática; la segunda corresponde al transcrito neonatal (18N) y consiste en una proteína truncada de solo dos dominios, resultando en un canal no funcional. La tercera variante carece totalmente de dicho exón por lo que es designada como $\Delta 18$, no obstante, genera una proteína funcional relacionada con la invasividad de células de melanoma y de macrófagos de leucemia humana. En el presente trabajo se cuantificaron los niveles de expresión de dichas variantes en líneas celulares de CaCu (SiHa, HeLa, C33A), neuroblastoma (IMR-32) y células HEK-293 que expresan establemente el canal Nav1.6 (HEK-Nav1.6). Los resultados indicaron un nivel de expresión moderada de las tres variantes en las células estudiadas, excepto para las HeLa, cuya expresión fue clasificada como baja. Conforme a lo esperado, ambos grupos celulares, de CaCu y de neuroblastoma, expresan niveles de mRNA para la variante adulta significativamente menores que las células Hek-Nav1.6. Las células HeLa (positivas al VPH-18) mostraron los niveles de expresión más bajos de estas variantes respecto a las células SiHa (positivas a VPH-16) y las C33A (negativas a VPH). Los datos sugieren que la expresión de la variante adulta del canal Nav1.6 se ve favorecida en células de CaCu positivos a VPH-16 por sobre el tipo 18 del

virus. Asimismo, la mayor expresión de la variante $\Delta 18$ en las células SiHa con respecto a las HeLa no se correlaciona positivamente con su capacidad metastásica. Se requiere de experimentos funcionales para poder correlacionar los niveles de expresión de la variante $\Delta 18$, así como de la 18A y 18N, del gen *SCN8A* y la capacidad metastásica de las células de CaCu.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología del cáncer cervicouterino (CaCu)

1.1.1 Incidencia y mortalidad del CaCu a nivel mundial

En la actualidad, las enfermedades no transmisibles son las responsables de la mayor parte de las muertes a nivel mundial, y el cáncer se espera que clasifique como la principal causa de muerte y barrera más importante que impida el aumento de la esperanza de vida en muchos países del mundo. Se estimó que, en el año 2016, el cáncer ocupó la segunda causa de muerte -precedido por las enfermedades cardiovasculares- con aproximadamente 9 millones de defunciones antes de los 70 años de vida (Organización Mundial de la Salud, 2020).

El cáncer es un término genérico que se emplea para englobar un inmenso grupo de enfermedades que se caracterizan por la proliferación exacerbada de células que presentan mutaciones génicas o aberraciones cromosómicas, con la capacidad de invadir diferentes partes del cuerpo contiguas y/o órganos más lejanos. Los casos de incidencia y mortalidad asociados al cáncer están aumentando rápidamente a nivel mundial. Las razones son complejas, pero reflejan tanto la edad como el crecimiento de la población y los cambios en la prevalencia y distribución de los principales factores de riesgo, muchos de los cuales están asociados con el desarrollo socioeconómico (Organización Mundial de la Salud, 2018).

En particular, el cáncer cervicouterino (CaCu) presentó 604,127 casos de incidencia y 341,831 defunciones a nivel mundial en el año 2020, posicionándose en cuarto lugar como cáncer más frecuente diagnosticado y como principal causa de muerte en mujeres (Sung et al., 2021). Además, el CaCu se posiciona en segundo lugar en incidencia y mortalidad precedido por el cáncer de mama en regiones con Índice de Desarrollo Humano bajo (**Fig. 1**). Las mayores tasas de incidencia y mortalidad se registran en el continente africano, con elevadas tasas en Sur África (Swazilandia con la mayor tasa de incidencia), África oriental (Malawi-con la mayor tasa de mortalidad- y Zimbabue) y África Occidental (Guinea, Burkina Faso y Mali) (Bray et al., 2018).

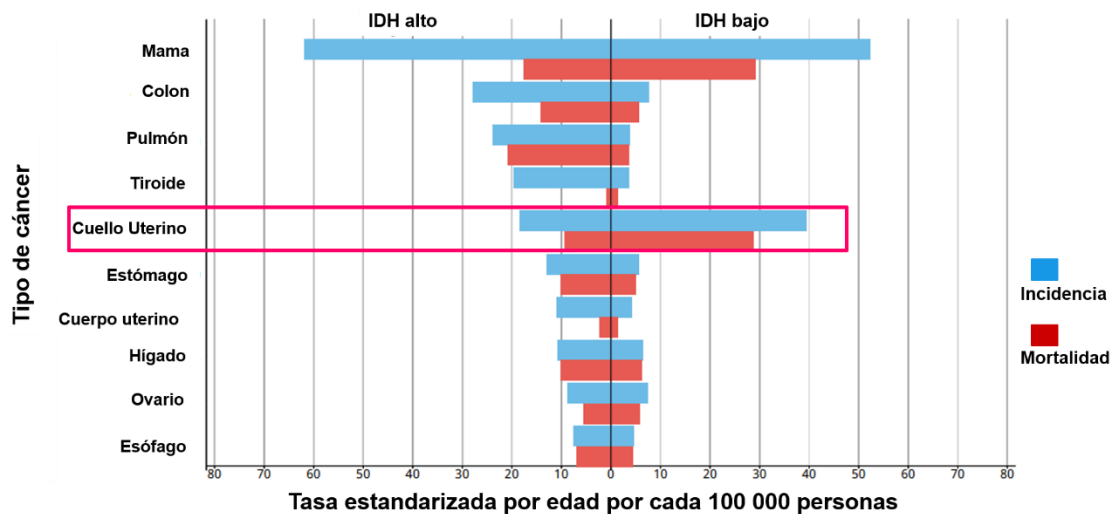


Figura 1. Tasas de incidencia y mortalidad de diferentes tipos de cáncer en mujeres. Los datos se presentan estandarizados por edad, en regiones que presentan índice de desarrollo humano (IDH) alto versus regiones que presentan IDH bajo. Modificado de: Organización Mundial de la Salud, 2020.

1.1.2 Incidencia y mortalidad del CaCu en México

La magnitud de los efectos del cáncer en la salud del país no es muy diferente al panorama mundial, pues representa la tercera causa de muerte, solamente precedido por las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. Además, de acuerdo con estimaciones de organismos internacionales, los carcinomas de mama, próstata, cervicouterino, colorrectal y de pulmón son los más recurrentes en la población en general en ambos sexos. Según las estadísticas más actualizadas, para el año 2020 se reportó una tasa de incidencia y de mortalidad de 195,449 y 90,222, respectivamente; posicionándose dentro de los primeros lugares el cáncer de mama, de próstata, colorrectal, de tiroides y cervicouterino (Sung et al., 2021).

En particular, el CaCu, ocupó el segundo lugar en incidencia entre los tipos de cáncer más predominantes dentro del sexo femenino con 9,439 casos nuevos (**Fig. 2A**); y segundo lugar en mortalidad entre los tipos de cáncer que afectan a mujeres mayores de 15 años con 4,335 defunciones en el año 2020 (**Fig. 2B**) (Sung et al., 2021).

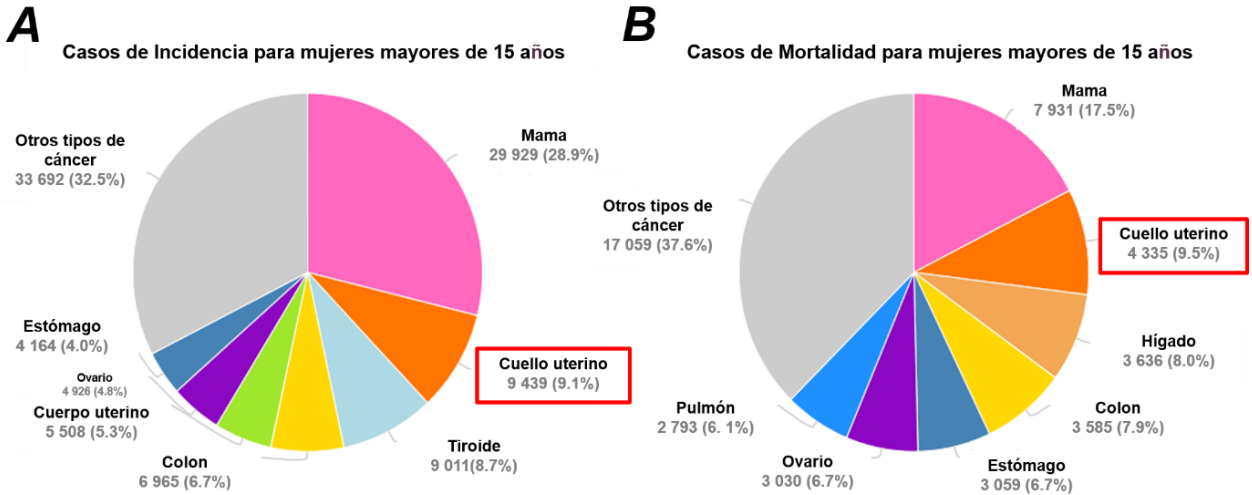


Figura 2. Tasas de incidencia (A) y mortalidad (B) de los principales tipos de cáncer en mujeres mayores de 15 años en México para el año 2020. Modificado de: Sung et al., 2021.

Actualmente, los tratamientos convencionales que se emplean para combatir el cáncer incluyen cirugía, quimioterapia y radiación gamma. Además de los severos efectos adversos que pueden ocasionar el empleo de estos tratamientos, las tasas de sobrevivencia de los pacientes son, en algunos casos, muy bajas. Por esta razón, resulta esencial dilucidar nuevas estrategias de diagnóstico y tratamiento con el objetivo de obtener un mejor pronóstico y, de esta manera, incrementar las tasas de sobrevivencia para los pacientes con cáncer. En este sentido, son varios los estudios que demuestran que los canales iónicos -proteínas de membrana especializadas en el flujo de iones- están involucrados en el desarrollo de muchas enfermedades asociándolos, específicamente, a diferentes características cruciales en el desarrollo del cáncer. Por tales motivos, el presente trabajo de investigación se enfoca en los cambios que se presentan en la expresión de los canales iónicos activados por voltaje y, en particular, en aquellos que transportan el ion sodio de manera selectiva en el fenómeno metastásico del CaCu. Para un mejor entendimiento del tema, en los siguientes párrafos se describen las particularidades de dichos canales, así como su participación en el CaCu. Resulta de suma importancia estudiar este tipo de cáncer pues no obstante que el uso reciente de vacunas es muy prometedor, la eficiencia de estas sólo podrá ser evaluado dentro de varias décadas. Además, debemos tener en cuenta que estas vacunas no confieren

protección contra todos los tipos de VPH de alto riesgo, lo cual puede aumentar los casos de CaCu generados por los tipos de VPH para los cuales las vacunas no generan protección.

1.2 Canales iónicos activados por voltaje

1.2.1 Los canales iónicos activados por voltaje y el cáncer

Los cambios en las cargas eléctricas a través de la membrana celular son absolutamente necesarios para mantener la homeostasis celular. Una vez que se inicia la apertura de los canales iónicos bajo distintas condiciones de estimulación, se produce una alteración en los patrones de distribución de cargas a ambos lados de la membrana plasmática, debido al flujo de iones que se produce a través de dichos canales, tales como K^+ , Na^+ , Ca^{2+} y Cl^- . Tradicionalmente, los canales iónicos activados por voltaje (CIAV) han sido conocidos por su papel fundamental en la generación de señales bioeléctricas rápidas como, por ejemplo, potenciales de acción y contracción muscular, entre otras (Hille, 2001). Sin embargo, varias investigaciones han demostrado que esta clase de proteínas puede contribuir significativamente a señales bioquímicas de mitosis celular, progresión de ciclo celular y regulación del volumen celular; siendo todas estas funciones de importancia crítica en el proceso de proliferación de células cancerígenas. Interesantemente, una variedad de CIAV se encuentran sobre expresados en diferentes tipos de cáncer, con respecto al tejido no canceroso. En este mismo sentido, expresiones aberrantes de CIAV específicos han sido asociados con varias etapas del cáncer y un aumento de la agresividad (Rao et al., 2015).

- *Canales de potasio activados por voltaje (canales K_v)*

Los canales K_v son proteínas formadoras de canales permeables selectivamente a los iones potasio (K^+) y abarcan una amplia familia de grupos heterogéneos de canales iónicos formada por 12 subfamilias (K_v1 - K_v12). La actividad de estos canales se basa en los cambios generados en el potencial de membrana y, fundamentalmente, en la regulación del establecimiento del potencial de membrana tanto en células excitables como no excitables (Miller, 2000).

Sin embargo, varios canales K_v presentan una expresión aberrante en diferentes tejidos cancerosos metastásicos y la alteración de su actividad conlleva a varios aspectos de la biología del cáncer (Ding et al., 2007). Por ejemplo, se ha reportado la expresión aberrante del canal $K_v10.1$ en varios tumores, así como en líneas celulares de cáncer (Asher et al., 2010; Hartung et al., 2011). Siendo más específicos, podemos destacar el papel del canal $K_v9.3$ en la proliferación de células de carcinoma de colon, así como en células de adenocarcinoma de pulmón (Lee et al., 2015). Además, estudios recientes, han mostrado la participación de los canales $K_v2.1$ y $K_v1.3$ en la migración de células de cáncer de próstata (Park et al., 2021) y osteosarcoma (Wu et al., 2013), respectivamente.

- *Canales de calcio activados por voltaje (canales Ca_v)*

Los canales Ca_v son los mediadores críticos del influjo de iones Ca^{2+} en células excitables, donde son los responsables de la secreción de hormonas y neurotransmisores, expresión de genes y contracción muscular; sin embargo, se ha visto que en células no excitables estos canales modulan y controlan la proliferación celular (Catterall et al., 2005).

Se ha identificado la sobre expresión y el incremento concomitante de los niveles proteicos del canal $Ca_v1.3$ en biopsias de cáncer de próstata (Chen et al., 2014); además, de manera interesante, se encontró que la sobre expresión del canal $Ca_v3.1$ en líneas celulares de adenocarcinoma de mama humano suprime la proliferación celular y que el silenciamiento del gen *CACNA1G*, el cual codifica para dicha isoforma del canal, promueve la proliferación celular (Ohkubo & Yamazaki, 2012). Adicionalmente, se ha demostrado la sobre expresión de canales Ca_v3 (o Tipo T) en el proceso de metástasis de células de melanoma (Das et al., 2013) y de glioblastoma (Valerie et al., 2013).

- *Canales de sodio activados por voltaje (canales Na_v)*

Los canales Na_v son proteínas transmembranales que permiten el paso de iones Na^+ hacia el interior celular provocando una despolarización de la membrana celular, lo que a su vez origina la generación y propagación de potenciales de acción en células excitables incluyendo neuronas, corazón y tejido esquelético. Estos canales se encuentran organizados en una familia con nueve miembros identificados como $Na_v1.1$ -

Nav1.9. Dicha clasificación está basada en el porcentaje de similitud de la subunidad α que da lugar a cada uno de los miembros de la familia (Fig. 3A). La subunidad α es la proteína formadora del poro y contiene todos los elementos estructurales, como el sensor de voltaje y el filtro de selectividad, que permiten el flujo selectivo de iones Na^+ a través de la membrana. Esta subunidad principal puede asociarse a una o más subunidades β (β_1 , β_2 , β_3 y/o β_4), mismas que regulan la expresión y la cinética de estos canales (Yu & Catterall, 2003).

En los últimos años, el incremento en la expresión de los canales Nav en varios tipos de cáncer ha sido extensamente reportado. Podemos citar, como ejemplo, la expresión abundante del canal Nav1.5 en líneas celulares de cáncer de mama (Fraser et al., 2005); el canal Nav1.6, en cáncer cervical (Hernandez-Plata et al., 2012) y el canal Nav1.7, en cáncer gástrico (Xia et al., 2016). La expresión y la actividad de los canales Nav resulta relevante en líneas celulares fuertemente metastásicas, por ejemplo: en la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama (Roger et al., 2003) y PC3 de cáncer de próstata (Diss et al., 2001); asociándose su actividad con los procesos de proliferación, migración e invasión (Bennett et al., 2004; Davis et al., 2012).

1.2.2 Estructura molecular e isoformas de los canales Nav

Los canales Nav de eucariontes están formados por una subunidad α principal, la cual está compuesta por una única cadena polipeptídica de aproximadamente 2000 aminoácidos (aa) organizados en cuatro dominios homólogos (DI-DIV), cada uno compuesto por seis segmentos transmembranales helicoidales nombrados S1-S6, y una o más subunidades accesorias β (Catterall, 2012; Ahern et al., 2016) (**Fig. 3A**). En humanos existen 9 subunidades α diferentes denominadas Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.5, Nav1.6, Nav1.7, Nav1.8 y Nav1.9 codificadas por los genes *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN3A*, *SCN4A*, *SCN5A*, *SCN8A*, *SCN9A*, *SCN10A* y *SCN11A*, respectivamente (**Fig. 3C**). Una herramienta muy empleada para discriminar entre los canales Nav es su sensibilidad a la tetrodotoxina (TTX); siendo Nav1.1-Nav1.4, Nav1.6 y Nav1.7 bloqueados por concentraciones nanomolares de TTX, mientras que Nav1.5, Nav1.8 y Nav1.9, por concentraciones micromolares (Catterall et al., 2005). En el

genoma de mamíferos encontramos cuatro genes (*SCN1B-SCN4B*) que codifican cinco subunidades β proteicas designadas como $\beta 1$, $\beta 1B$, $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 4$. Las subunidades $\beta 2$ y $\beta 4$ se unen a la subunidad α mediante puentes disulfuro, mientras que las subunidades $\beta 1$ y $\beta 3$ se asocian de manera no covalente. Todas las subunidades β son proteínas transmembranas (excepto $\beta 1B$) con un solo segmento transmembranal y un dominio extracelular prominente similar a las inmunoglobulinas (dominio Ig) con propiedades de adhesión. Aunque las subunidades α por sí solas son suficientes para formar un canal funcional, las subunidades β modulan las características de activación e inactivación dependientes de voltaje, cinética de las corrientes, así como los niveles de expresión de los canales Nav (Isom et al., 1995; Qu et al., 1995).

Los segmentos transmembranales S1-S4 de cada dominio de la subunidad α constituyen el dominio sensor de voltaje (VSD, por sus siglas en inglés) cuya función es regular la apertura del canal una vez que ocurre la despolarización de la membrana. Los cuatro VSD de cada subunidad α están organizados alrededor del dominio poro del canal (PD, por sus siglas en inglés), el cual está formado por los segmentos S5-S6 de cada dominio y el asa que une ambos segmentos transmembranales (conocida como asa del poro). El mecanismo por el cual el VSD responde al voltaje involucra la participación de los aminoácidos lisina y arginina (con carga neta positiva), posicionados cada tres residuos en el segmento transmembrana S4, el cual se desplaza a lo ancho de la membrana plasmática en respuesta al cambio del potencial de membrana. Este movimiento del VSD es transferido al PD causando un cambio conformacional que permite la apertura del canal (Catterall, 2012). El PD incluye el filtro de selectividad, el cual constituye la región más estrecha del poro del canal con una composición invariante de aspartato en el DI, glutamato en el DII, lisina en el DIII y alanina en el DIV. Su función principal es permitir el flujo selectivo de iones sodio parcialmente hidratados a través del poro acuoso del canal (**Fig. 3B**).

Los canales Nav están sujetos a un amplio número de modificaciones postraduccionales, entre ellas: fosforilación, glicosilación, palmitoilación, ubiquitinación y metilación; lo cual refleja la diversidad de expresión de estos canales y el papel desempeñado por tales modificaciones en la modulación de su función (Shen et al., 2017). Adicionalmente,

estudios recientes han revelado la existencia de fenestraciones, las cuales constituyen accesos laterales que conectan el exterior de la proteína del canal con el poro central funcionando como ruta de acceso al poro para pequeños bloqueadores hidrofóbicos (Kaczmarek & Corry, 2014).

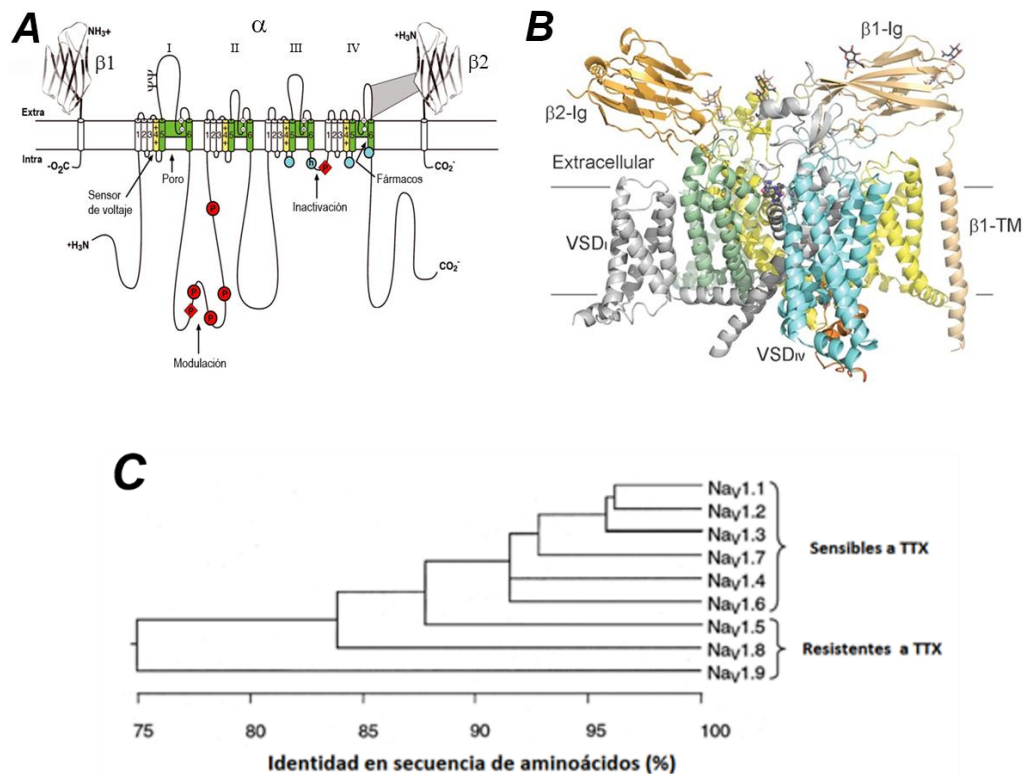


Figura 3. Representación esquemática, estructura y similitud en la secuencia aminoacídica de los canales Nav. **A)** Topología del complejo proteico de los canales Nav. La subunidad principal α consiste en cuatro dominios (I-IV) conectados por lazos intracelulares. A su vez, cada dominio está constituido por seis segmentos transmembranales (S1-S6), donde los segmentos S1-S4 forman el dominio sensor de voltaje (VSD) y S5, S6 y el asa que los une forman el dominio del poro del canal (PD). El asa intracelular que conecta los dominios III y IV contiene la compuerta de inactivación rápida. El asa que une los dominios I y II contiene varios sitios de fosforilación (P). También se esquematizan dos subunidades auxiliares β a los costados de la subunidad α . Modificado de: Catterall, 2012. **B)** Vista lateral de la estructura del canal Nav1.7 de humano en complejo con las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ obtenida a una resolución de 3.2 Å mediante la técnica de criomicroscopía electrónica. Cada uno de los cuatro dominios están identificados con diferentes colores, así como las dos subunidades β . Únicamente la región transmembranal de la subunidad $\beta 1$ ($\beta 1$ -TM) pudo ser resuelta con esta técnica. La compuerta de inactivación rápida constituida por los aminoácidos Ile/Phe/Met (IFM) se resalta en color naranja. Modificado de: Shen et al., 2019. **C)** Porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos de las subunidades α de los canales Nav realizado con el programa Clustal W. También se indica la clasificación de acuerdo con la sensibilidad al bloqueo por la TTX. Modificado de: Catterall et al., 2005.

1.2.3 Contribución de los canales Nav a la capacidad metastásica de las células cancerígenas

Además de células excitables, las cuales incluyen nervio, músculo y células neuroendocrinas (Yu & Catterall, 2003); los canales Nav también se expresan en células no excitables, como: linfocitos, células endoteliales, fibroblastos, macrófagos, osteoblastos, células de Schwann, y varias líneas celulares derivadas de carcinomas (Diss et al., 2004). En estas células, los canales Nav participan en funciones celulares diferentes de aquellas asociadas canónicamente y que se relacionan con la migración, acidificación endosomal, fagocitosis, formación de podosoma, liberación de insulina y de citocinas (Besson et al., 2015; Patel & Brackenbury, 2015; Eren et al., 2015).

En algunas células tumorales, la actividad de los canales Nav está involucrada en la regulación de la proliferación, la migración y la invasividad de las células. Las subunidades α funcionales de los canales Nav se sobre expresan en biopsias y en líneas celulares de varios tipos de cáncer como: próstata, mama, pulmón, leucocitos, pleura, colón, ovario y cuello uterino (Roger et al., 2015). Se ha comprobado que la subunidad α Nav1.7 genera corrientes de sodio entrantes en la línea celular MAT-LyLu de carcinoma prostático (Grimes & Djamgoz, 1998; Ding & Djamgoz, 2004) y, además, es expresada abundantemente en cáncer gástrico humano donde induce un incremento en la expresión del intercambiador Na^+/H^+-1 (NHE-1), así como de la proliferación e invasividad celular (Xia et al., 2016). La subunidad α Nav1.5 se encuentra sobre expresada en cáncer de mama humano altamente agresivo, cuya función principal no ha sido asociada con la generación de potenciales de acción, por el contrario, se conoce que la progresión *in vivo* hacia carcinoma de mama está directamente relacionado con un incremento en la cantidad y la actividad de la subunidad α Nav1.5 (Fraser et al., 2005). Además, se ha demostrado que dicha subunidad promueve la degradación de la matriz extracelular al incrementar la actividad del intercambiador NHE-1 (Brisson et al., 2011) y mediante la activación consecutiva de las catepsinas cisteína ácidas; conllevando a la formación de invadopodios, los cuales permiten el fenómeno de invasividad celular (Brisson et al., 2013; Roger et al., 2015).

Adicionalmente, la pérdida del gen *SCN4B* en células de cáncer de mama, el cual codifica para la subunidad $\beta 4$ de los canales Nav, promueve la adquisición de un fenotipo híbrido ameboide - mesenquimal asociado con el proceso metastásico (Bon et al., 2016). La correlación positiva con la invasividad, la proliferación y la migración celular ha sido descrita también para las subunidades $\beta 1$ (Nelson et al., 2014) y $\beta 2$ (Jansson et al., 2014) en células de cáncer de mama y de próstata, respectivamente.

El gen *SCN8A* codifica para la subunidad α Nav1.6, uno de los principales canales Nav involucrados en la iniciación y la propagación de los potenciales de acción en células excitables del sistema nervioso central y periférico (Zakon, 2012). Se ha encontrado que esta subunidad se expresa en vesículas intracelulares en células de macrófagos derivados de leucemia monocítica humana y en células de melanoma humano invasivo; cuya actividad contribuye a la invasión celular a través de sus efectos en la formación de podosomas e invadopodio mediante un mecanismo que involucra movimiento intracelular de iones sodio y calcio, así como la remodelación de los filamentos de actina en estas células (Carrithers et al., 2009). Además, se ha comprobado que los canales Nav1.6 se expresan sustancialmente en la membrana plasmática y en los compartimentos intracelulares de células de cultivo primario, así como en biopsias de CaCu, a diferencia de muestras de tejido cervicouterino no canceroso donde las proteínas de canal se limitan solamente a la membrana plasmática (Hernandez-Plata et al., 2012).

2. ANTECEDENTES DIRECTOS

En el año 2012, nuestro grupo de investigación reportó resultados relacionados con la determinación cuantitativa de los niveles de expresión de los mRNA de las subunidades α Nav1.1, Nav1.2, Nav1.4, Nav1.6 y Nav1.7 de los canales Nav en muestras de CaCu respecto a muestras no cancerosas; obteniendo que, de todas las isoformas estudiadas, el canal Nav1.6 es específicamente sobre expresado alrededor de 40 veces más en muestras de CaCu positivo a VPH 16 que en muestras no cancerosas (Hernandez-Plata et al., 2012) (**Fig. 4**).

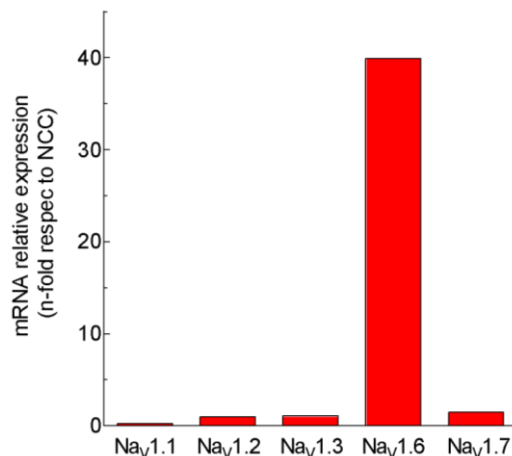


Figura 4. Niveles de expresión relativa de las subunidades α de canales Nav en muestras de CaCu positivas a VPH16 con respecto a cérvix no canceroso. La subunidad α Nav1.6 se sobre expresa específicamente 40 veces más en las muestras de CaCu positivas a VPH16. Tomado de: Hernandez-Plata et al., 2012.

Además, identificaron que dicha isoforma tiene una contribución directa en la capacidad invasiva de células de CaCu, sin afectar significativamente la migración celular (Hernandez-Plata et al., 2012) (**Fig. 5**). Recientemente, también se investigó si la sobre expresión del gen *SCN8A* era una característica compartida para los casos de CaCu positivos a otros tipos de VPH oncogénicos; obteniéndose que dicho gen es sobre expresado en todas las muestras de CaCu invasivo estudiadas independientemente del tipo de VPH al que eran positivas. No obstante, dicha sobre expresión no fue observada para los casos de neoplasias cervicales de bajo (NIC1) y alto (NIC2/3) grado, apoyando la hipótesis que la sobre expresión del gen *SCN8A* está asociado con la transformación de las células del epitelio humano cervicouterino (Lopez-Charcas et al., 2018) (**Fig.6**).

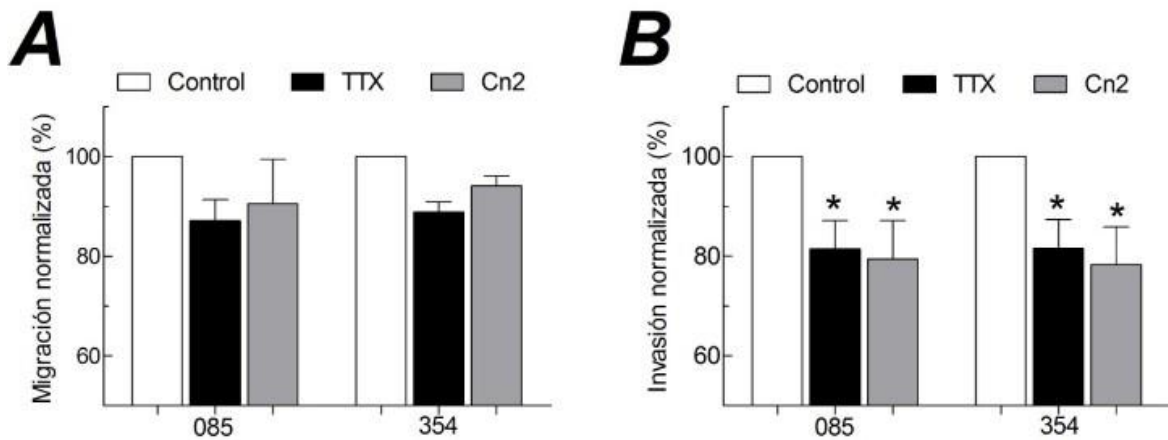


Figura 5. Contribución del canal $Na_v1.6$ a la invasividad celular *in vitro* de células de CaCu positivas para VPH16. A) La migración relativa de las células de CaCu en los cultivos primarios 085 y 354, bajo condiciones de TTX (bloquea todos los canales sensibles a la TTX) y toxina Cn2 (bloquea específicamente al canal $Na_v1.6$), no disminuye significativamente respecto a la condición control (ausencia de las toxinas). **B)** La invasión relativa de las células de CaCu de los cultivos primarios 085 y 354 bajo las mismas condiciones demostró que cuando se bloquean específicamente los canales $Na_v1.6$ disminuye significativamente la invasividad celular con respecto al control, sugiriendo que estos canales participan activamente en la capacidad invasiva de las células de CaCu positivas a VPH16. Tomado de: Hernandez-Plata et al., 2012.

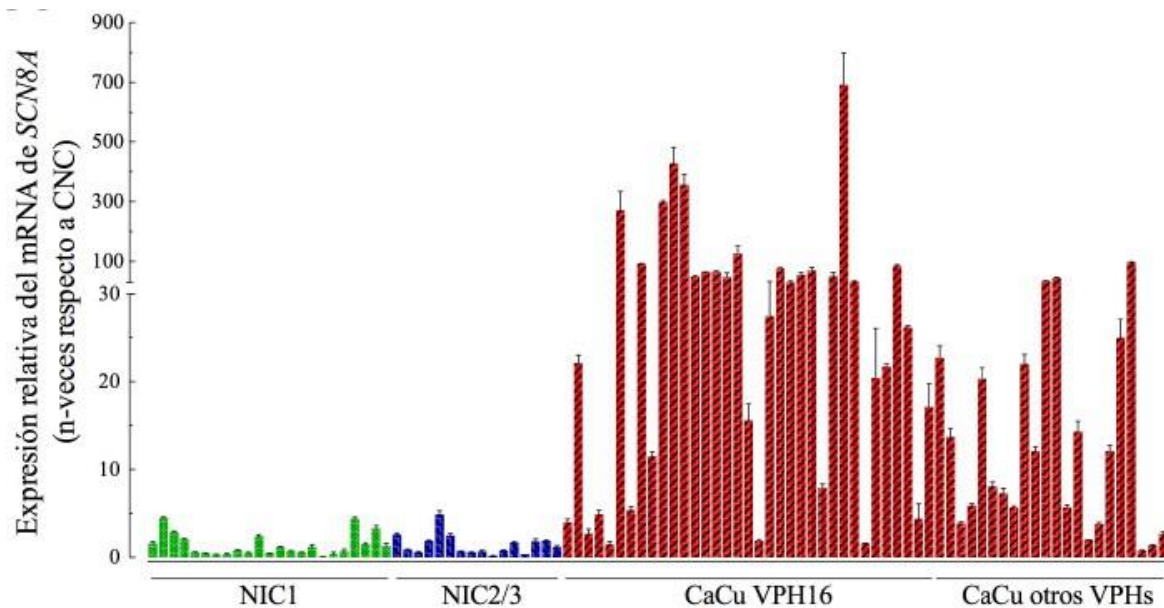


Figura 6. Niveles de expresión relativa del gen *SCN8A* en la secuencia neoplasia de bajo grado - neoplasia de alto grado - carcinoma en tejido cervicouterino humano. Las barras muestran el número de veces que cambia la expresión relativa del mRNA del gen *SCN8A* para cada grupo de muestras con respecto al control, demostrándose en las muestras de neoplasias cervicales de bajo (NIC1) y alto grado (NIC2/3) no presentan sobre expresión de *SCN8A*, lo cual ocurre hasta que el CaCu es invasivo e independientemente del tipo de VPH oncogénico expresado. Tomado de: Lopez-Charcas et al., 2018.

También se conoce que las subunidades α de los canales Nav de mamíferos presentan dos sitios principales de procesamiento alternativo del mRNA. El primero tiene lugar en el exón 5, generando las variantes 5A y 5N de los genes *SCN2A*, *SCN3A* y *SCN8A*. Dicho exón codifica parte del segmento S3 y completamente el segmento S4 del dominio I de las subunidades α neuronales Nav1.1, Nav1.3 y Nav1.6, respectivamente (Sarao et al., 1991). Específicamente para el gen *SCN8A*, el segundo sitio de procesamiento alternativo del mRNA se localiza en el exón 18, el cual codifica los segmentos transmembranales S3-S4 del dominio III de la subunidad α de Nav1.6. El procesamiento alternativo de este exón genera tres variantes diferentes que se pueden identificar mediante PCR utilizando oligonucleótidos o *primers* específicos que hibridan en los extremos del exón 17 (5') y 19 (3') (**Fig. 7A**). La variante 18A se denomina variante adulta y es la que se expresa funcionalmente en la membrana plasmática de la mayoría de las neuronas (Burbidge et al., 2002). El producto de PCR que se obtiene para la variante 18A es de 364 pb y contiene a los exones 17, 18A y 19; correspondiendo al transcrito completo del gen *SCN8A*. El producto correspondiente de la variante 18N (variante neonatal) presenta una longitud de 309 pb; debido a la presencia de un codón de paro en el exón 18 alternativo, 18N, que genera una proteína truncada de solo dos dominios (1282 aminoácidos) y constituye una proteína no funcional. La variante Δ 18 presenta un producto de PCR de 241 pb y el transcrito mantiene un marco abierto de lectura; pero pierde completamente el exón 18, y se genera una proteína funcional que carece de un tercio del dominio III (incluyendo un sensor de voltaje) de la subunidad α Nav1.6 (Plummer et al., 1997). La expresión de esta variante ha sido reportada en vesículas intracelulares regulando la invasión celular de macrófagos y células de melanoma (Carrithers et al., 2009).

Con base en los reportes de Carrithers y cols. (2009), nuestro grupo de trabajo evaluó mediante la técnica de PCR estándar la presencia de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A* en líneas celulares de CaCu, en tejido de cuello uterino no canceroso y biopsias de CaCu y (**Fig. 7B-D**). Los resultados demostraron que las isoformas 18N y Δ 18 se expresan en todos los grupos de muestras estudiados, aunque fueron más abundantes en las muestras de CaCu independientemente del tipo de VPH oncogénico presente

(Fig. 7D). Con respecto a la variante adulta 18A, se encontró en el 58% de las muestras de cérvix no canceroso, en el 33% de muestras de CaCu positivas para VPH18 y en el 100% de las muestras de CaCu positivas para VPH16. Por su parte, las variantes 18N y $\Delta 18$, se expresaron predominantemente en las líneas celulares y en biopsias de CaCu humano positivos para VPH16 y VPH18, mientras que la variante adulta 18A estuvo prácticamente ausente en el primer caso (Lopez-Charcas et al., 2018).

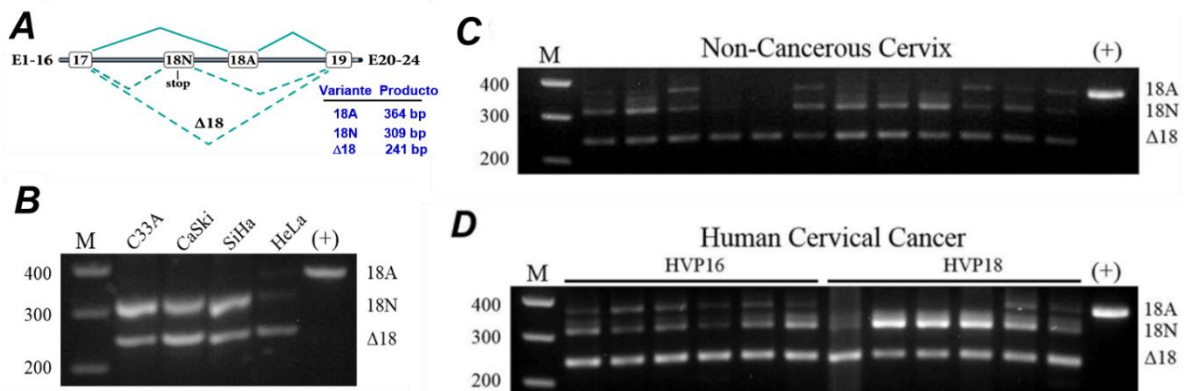


Figura 7. Procesamiento alternativo del exón 18 del gen *SCN8A* y expresión de sus variantes en CaCu. **A)** El diagrama representa la estructura genómica expandida desde el exón 17 al 19 del gen *SCN8A* con la finalidad de ilustrar el procesamiento alternativo del exón 18. El exón 18N contiene un codón de paro prematuro en el marco de lectura. Las variantes generadas por el procesamiento alternativo del exón 18 están indicadas con la longitud de los productos de PCR esperados. Expresión de las variantes 18A, 18N y $\Delta 18$ del exón 18 del gen *SCN8A* en líneas celulares de CaCu (**B**); muestras de cérvix no canceroso, (**C**) y muestras de CaCu invasor (**D**). La línea celular HEK-293 que expresa de manera estable el canal $Na_v1.6$, fue usada como control positivo para la variante adulta 18A. Modificado de: Lopez-Charcas et al., 2018.

No obstante, actualmente, no se existen reportes donde se cuantifiquen los niveles de expresión del mRNA de cada una de estas variantes ni la contribución de estas a la capacidad metastásica de líneas celulares de CaCu. Por tales razones, en el presente trabajo de investigación nos propusimos la siguiente hipótesis y objetivos.

3. HIPÓTESIS

La variante $\Delta 18$ del gen *SCN8A* tendrá una contribución relevante a la capacidad metastásica de células de cáncer cervicouterino.

4. OBJETIVOS GENERALES

- 1- Cuantificar los niveles de expresión de cada una de las variantes del procesamiento alternativo del exón 18 del gen *SCN8A* en líneas celulares de CaCu humano.
- 2- Evaluar el nivel de contribución de cada una de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A* en la capacidad metastásica de células de CaCu humano.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Establecer los rangos dinámicos de las sondas *Custom Taqman*.
- 2- Caracterizar los amplicones de qPCR mediante digestión con enzimas de restricción y estudios de secuenciación automática.
- 3- Cuantificar los niveles de expresión de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A* mediante ensayos de qPCR.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cultivos de líneas celulares de CaCu

Las líneas celulares de CaCu humano, así como la línea celular de neuroblastoma IMR-32 (**Tabla 1**), fueron obtenidas originalmente de la *American Type Culture Collection* (ATCC; Manassas, VA, EUA). Las células HEK-293 transfectadas establemente con la variante adulta del gen *SCN8A* (HEK-Nav1.6), fueron donadas por GlaxoSmithKline Research & Development Limited (Stevenage, Reino Unido). Todas las células se mantuvieron almacenadas en nitrógeno líquido hasta que se requirió del descongelamiento de un vial de cada una de ellas para iniciar el cultivo celular.

Tabla 1. Información general de las líneas celulares utilizadas en el presente estudio

	C33A	SiHa	HeLa	IMR-32
Organismo	<i>Homo sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
Tipo celular	Epitelial	Epitelial	Epitelial	Neuroblasto
Tejido	Cuello uterino	Cuello uterino	Cuello uterino	Abdominal (metástasis del cerebro)
Enfermedad	Carcinoma	Carcinoma de células escamosas de grado II	Adenocarcinoma	Neuroblastoma
Genotipo VPH	Negativo	VPH-16	VPH-18	-
Edad de la paciente	66 años	55 años	31 años	13 meses
Etnicidad	Caucásico	Asiática	Negra	Caucásico

Posterior a su descongelamiento, las células se sembraron en cajas Petri de plástico 60 mm y se crecieron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Medium; GIBCO-Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) rico en glucosa (4 500 mg/L) y suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1 mM de piruvato de sodio, 25 mM HEPES, 100 µg/mL de estreptomina, 100 U/mL de penicilina y 2 mM de L-glutamina. Una vez que la monocapa de células adherentes alcanzó una confluencia entre 85 y 90% (cada 3-4 días aproximadamente), el medio de cultivo se retiró mediante succión con ayuda de una

pipeta Pasteur y las células se lavaron dos veces con una solución amortiguadora de fosfatos o PBS (154 mM NaCl, 3 mM Na₂HPO₄ y 1.06 mM KH₂PO₄, pH 7.2). Posteriormente, el PBS se retiró mediante succión y se agregó 300 µL de una solución balanceada de Hanks libre de calcio con 0.05% de tripsina y 0.53 mM de EDTA. Después de 5 min de incubación, se adicionó 2 mL de medio DMEM suplementado a las líneas celulares de CaCu para inhibir la acción enzimática de la tripsina y los agregados celulares se disgregaron mecánicamente con el empleo de pipetas serológicas de 5 mL. Luego, una alícuota de esta suspensión celular fue sembrada a una dilución 1:10 en una nueva caja Petri de 60 mm; el volumen final en dichas cajas fue siempre de 4 mL de medio DMEM suplementado. Para las líneas celulares HEK-Nav1.6 e IMR-32 se siguió el mismo procedimiento excepto que para estos casos se trabajó con medio DMEM/F-12 (DMEM: Nutrient Mixture F-12; GIBCO-Life Technologies) y se sembraron a una dilución 1:10 y 1:2, respectivamente. Todas las líneas celulares de nuestro estudio fueron mantenidas en una incubadora a 37°C en una atmósfera saturada de agua, compuesta del 95% de oxígeno y 5% de CO₂.

5.2 Transfección de células HEK-293 ordinarias con el plásmido H41

El plásmido H41 es una construcción molecular compuesta por el vector pcDNA3.1(-) (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific) y el cDNA de la variante Δ18 del gen *SCN8A* subclonado en el sitio *EcoRI* de la región múltiple de ligación del vector. El cDNA de la variante Δ18 del canal Nav1.6 se clono a partir de células HeLa en experimentos realizados previamente por la Dra. Belén Ramírez en nuestro laboratorio. El DNA plasmídico fue amplificado en bacterias *E. coli* químicamente competentes de la cepa JM-109 y, una vez purificado mediante el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen), se utilizó para transfectar células HEK-293 ordinarias (en adelante llamadas HEK-H41). Brevemente, los experimentos de transfección se realizaron en cajas multipozos de 6, en cada uno de los cuales se sembraron células HEK-293 ordinarias un día antes de la transfección. Las células se transfectaron a una confluencia aproximada del 80% utilizando el reactivo PEI (*Polyethyleneimine*; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) a una concentración de 1 µg/ µL. El protocolo consistió en someter los cultivos

celulares a condiciones de deficiencia de SFB (DMEM/F-12 con 5% en lugar de 10%) durante 1 h previo a la adición de la mezcla de transfección al cultivo. Esta última estuvo compuesta de 3 µg del plásmido H41, 200 ng del cDNA de la proteína fluorescente verde (GFP), 9 µg del reactivo PEI y 180 µL de medio DMEM/F-12 con SFB al 5% para completar un volumen final de 200 µL. Esta mezcla se añadió al cultivo celular gota a gota y se incubó durante 6 h a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂. Una vez transcurrido el periodo de incubación, se sustituyó el medio de cultivo de la transfección por el medio DMEM/F-12 con 10% de SFB y se incubaron durante 48 h adicionales para garantizar el pico de expresión de la proteína del canal Nav1.6.

5.3 Extracción de RNA total

La extracción de RNA total de cada una de las líneas celulares se realizó utilizando el reactivo *TRIzol* (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) siguiendo el protocolo del fabricante para células adherentes. Luego de la homogenización de la muestra con el reactivo TRIzol se añadió cloroformo; el cual permite, junto con el fenol, la separación del homogenado en tres fases: una fase acuosa transparente superior que contiene a las moléculas de RNA, una interfase y una fase orgánica roja inferior que contiene las moléculas de DNA y proteínas. El RNA se precipitó de la fase acuosa con isopropanol, se lavó dos veces con etanol 75% y resuspendió en agua Milli-Q estéril. Las muestras de RNA total obtenidas se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso. La integridad del RNA total extraído se confirmó, mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. En todos los casos, la concentración del RNA total, así como su pureza, se cuantificó con el empleo del espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Solamente aquellas muestras que presentaron una relación A_{260}/A_{280} aproximada de 1.8 se utilizaron para los experimentos posteriores.

5.4 RT-PCR estándar

La obtención del DNA complementario (cDNA) a partir del RNA total extraído con el reactivo TRIzol se desarrolló con el empleo de la técnica de transcripción reversa. Esta

técnica se basa en la transcripción inversa de cDNA a partir de una hebra de RNA por la enzima transcriptasa inversa. Posteriormente, el cDNA resultante se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En el primer paso, la síntesis de cDNA a partir de 1 µg de RNA total se llevó a cabo con el uso del kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems; Foster City, CA, EUA) en un volumen final de 20 µL que incluyó: 2.0 µL de 10X RT Buffer, 0.8 µL de 25X dNTP Mix (100 mM), 2.0 µL de 10X RT Random Primers, 1.0 µL Transcriptasa Reversa MultiScribe™ MuLV, 4.2 µL de agua Mili-Q estéril y 10 µL de RNA (conteniendo 1 µg de RNA total). El ciclado térmico consistió en una primera etapa de 10 min a 25°C correspondiendo a la fase de hibridación de los *primers*, una segunda etapa de 120 min a 37°C en la cual se realiza la síntesis del cDNA y una tercera etapa de 5 min a 95°C en la cual se detiene la transcripción. El cDNA así obtenido se almacenó a 4°C.

El segundo paso consistió en la amplificación del cDNA mediante la técnica de PCR estándar. Los experimentos se llevaron a cabo empleando un termociclador programable de 96 pozos Veriti (Applied Biosystems) en un volumen final de 25 µL, que incluyó: 150 ng de cDNA molde, 2.5 µL de ThermoPol Reaction Buffer 10X, 1 U de Deep Vent DNA Polymerase, 200 µM de cada uno de los dNTPs y 0.5 µM de *primers* para el exón 18 del gen *SCN8A* y para el gen constitutivo de actina (**Tabla 2**).

Tabla 2. Características de los *primers* empleados en las reacciones RT-PCR estándar.

Gen	Secuencia de los <i>primers</i> 5'→3'	Producto esperado (pb)
Variantes del exón 18 de <i>SCN8A</i>	F: AAGTGGACAGCCTATGGCTTCG R: TGTTGACATCTTCAATTTCAAATCGG	18A: 367 18N: 314 Δ18: 244
Actina	F: GCTCGTCGTCGACAACGGCTC R: CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC	350

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

Las reacciones se sometieron a un ciclado térmico que consistió de un primer paso de activación enzimática a 95°C durante 2 min, seguido de 40 ciclos, cada uno con tres

etapas: 1) desnaturalización del DNA a 95°C durante 15 s; 2) hibridación de *primers* y DNA de 30 s a 61°C para las variantes del exón 18 de *SCN8A*, así como para el de actina (control); y, 3) una etapa elongación a 72°C durante 45 s. Un paso de extensión final de 72°C durante 5 min fue incluido en todos los experimentos. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador de luz UV.

5.5 PCR en tiempo real (qPCR)

La síntesis de cDNA a partir de RNA total se llevó a cabo de la misma manera que se describió para la PCR estándar. Posteriormente, el segundo paso consistió en la amplificación del cDNA mediante la técnica de PCR en tiempo real o qPCR, la cual es una modalidad de la PCR estándar, donde la acumulación de DNA amplificado es detectado y cuantificado a medida que la reacción avanza, es decir, “en tiempo real”. Esto se logra incorporando una molécula fluorescente que se asocia al DNA amplificado, donde el incremento de esta fluorescencia es proporcional al incremento de la cantidad de dichas moléculas de DNA en la reacción.

5.5.1 Rangos Dinámicos

Los experimentos de rangos dinámicos se realizaron utilizando el cDNA obtenido de células que presentaran una expresión moderada a alta de las variantes del exón 18 de interés. La línea celular HEK-Nav1.6 expresa de manera estable la forma adulta del canal Nav1.6 (Burbidge et al., 2002), por lo que estas células sirvieron como fuente de cDNA para la variante 18A. Las células IMR-32 fueron empleadas para estudiar los rangos dinámicos de las variantes 18N. Estas células provienen de un tumor metastásico abdominal diagnosticado como un neuroblastoma de un paciente caucásico de 13 meses de edad (Tumilowicz et al., 1970). Existen muchas evidencias de que la variante neonatal del canal Nav1.6 se expresa más abundantemente que la variante adulta en etapas tempranas del organismo, en parte porque la excitabilidad celular del sistema nervioso en las etapas tempranas del desarrollo se debe mayoritariamente al

canal de sodio Nav1.2, mientras que para la etapa adulta dicha función es realizada primordialmente por el canal Nav1.6 (Boiko et al., 2001; Kaplan et al., 2001). Finalmente, para estandarizar los ensayos de qPCR de la variante $\Delta 18$ se utilizaron células HEK-H41, antes mencionadas.

La primera serie de experimentos de qPCR se realizaron precisamente para estudiar los rangos dinámicos de las sondas *Custom TaqMan*[®] (**Tabla 3**) y así evaluar el rango de concentraciones de cDNA donde las sondas exhiben la mejor eficiencia en dichas reacciones. Para tal propósito, los ensayos de qPCR se desarrollaron por duplicado para cada muestra en un volumen final de 15 μ L, que incluyó: 3 μ L de cDNA molde diluido (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 o 1:32), 7.5 μ L de 2x *TaqMan Universal PCR Master Mix*, 0.3 μ L de 20X *Custom TaqMan*[®] *Gene Expression Assay* (Applied Biosystems) y 4.2 μ L de agua Milli-Q estéril.

Las reacciones de qPCR se realizaron en el termociclador Rotor-*Gene* Q (Qiagen; Hilden, Alemania), acoplado a una computadora que contiene el programa *Rotor-*Gene*[®]Q Software* versión 2.1.0.9 para la adquisición y análisis de resultados. Las condiciones de ciclado térmico fueron las siguientes: un paso de activación a 50°C durante 2 min, seguido por un paso de desnaturalización a 95°C durante 10 min, y luego 50 ciclos consistentes de dos etapas: desnaturalización a 95°C durante 15 min y de hibridación/elongación a 60°C durante 1 min. Posteriormente, con el programa SDS 1.2.2 se estableció manualmente un valor de umbral en la fase geométrica de la reacción para cada una de las sondas del gen *SCN8A* y del gen constitutivo HRPT-1. De este modo, el programa proporcionó los valores promedios del duplicado y de desviación estándar de *threshold cycle* o ciclo umbral Ct, definido como el número de ciclos requeridos para que la señal fluorescente sobrepase el valor umbral, para cada una de las muestras analizadas.

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

Variantes del exón 5 y 18 del gen <i>SCN8A</i>	Secuencia de los <i>primers</i> 5'→3'	Producto esperado (pb)
18A	F: CTCGGAAGTCTAGGTGCCATAAAGTC R: CCCTCATCCCTTCAAATCGTGATAA P: CTTAAGGGTCTCAAAGCTC	86
18N	F: TTCCTCATTGTGGCTGTACCATTAAA R: GCCCACCAAGGCATTACAC P: TCGCCCTTTACAGTCTCT	109
Δ18	F: CGTCAAGTTCTTCACCAATGCC R: GGATGGCGCCACCAA P: ACCACCACAGCCACAATG	83
5A	F: GGGATCCATGGAAGTGGTTAGATTT R: AACATTCAGGGTTCTCCGAGC P: AGTTTGTGGACCTGGG	109

F: oligonucleótido en sentido, R: oligonucleótido en antisentido, P: sonda TaqMan; 18A, 18N, Δ18, variantes adulta, neonatal y delta del exón 18 del gen *SCN8A*; 5A, variante adulta del exón 5 de *SCN8A*.

promedio de Ct de cada ensayo y el log de la concentración de cDNA se ajustaron al modelo de regresión lineal en el programa GraphPad Prism. Una vez obtenida la ecuación de la recta, se sustituyó el valor de la pendiente por S para calcular la eficiencia de la reacción mediante la siguiente ecuación: $E = 10^{\frac{-1}{S}} - 1$.

5.5.2 Cuantificación de los niveles de expresión de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A*

Una vez establecidos los rangos dinámicos, así como la eficiencia de los ensayos de qPCR, se procedió a la cuantificación relativa de los niveles de expresión del mRNA de las variantes del procesamiento alternativo del exón 18 del gen *SCN8A* en células de CaCu y neuroblastoma. Para ello, se siguió la metodología descrita previamente para las reacciones de qPCR empleada en los ensayos de rangos dinámicos. En esta ocasión se realizaron las reacciones por triplicado empleando la dilución de 1:4 de los cDNA de todas las muestras y se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Como controles internos de las reacciones se seleccionó al gen constitutivo HPRT-1 y a la variante adulta del exón 5 (5A; Hernandez-Plata et al, 2012). La cuantificación de esta variante

representa una estimación indirecta de la variante adulta del exón 18 (18A), ya que como se muestra en los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de la **Fig. 8**, la expresión de la variante 5A del canal Nav1.6 (Q9UQD0-2) asegura a su vez la expresión selectiva de la variante 18A. En los casos necesarios, los cambios en los niveles de expresión de las variantes con respecto a la muestra seleccionada como control fueron cuantificados por el método de $2^{-\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).



Figura 8. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de las 5 isoformas generadas por procesamiento alternativo del RNA del canal Nav1.6 (UniProt Q9UQD0). El exón 5 se encuentra compuesto por 32 residuos aminoacídicos (205-236) y existen dos variantes reportadas: la variante adulta (5A) y la variante neonatal (5N). La diferencia entre dichas variantes son dos aminoácidos en las posiciones 207 y 211, ocupadas por valina (V) y aspartato (D) en la variante 5A y por isoleucina (I) y asparagina (N) en la variante 5N, respectivamente. Por su parte, el exón 18 se encuentra compuesto por 42 aminoácidos para la variante adulta (18A), mientras que la variante neonatal (18N) es una proteína trunca con solo 1282 aminoácidos de los 1992 que componen la 18A; y la variante delta (Δ 18) por carecer completamente de dicho exón.

5.6 Subclonación de los productos de qPCR

Los productos amplificados mediante qPCR provenientes de los experimentos de rangos dinámicos descritos en la sección anterior, se subclonaron en el vector de secuenciación pJET1.2/blunt del kit *CloneJET PCR Cloning* (Fermentas-Thermo Fisher Scientific) con el objetivo de corroborar su identidad molecular mediante secuenciación automática. Las reacciones de ligación se llevaron a cabo durante 5 min a 22°C en un volumen final de 20 μ L que incluyó: 1 μ L del producto de reacción de qPCR, 10 μ L del Buffer de reacción 2X, 1 μ L de la enzima DNA Blunting, 1 μ L del vector de clonación pJET1.2, 1 μ L de la

enzima ligasa T4 y 6 μ L de agua libre de nucleasas. Esta mezcla de ligación se ocupó directamente para transformar bacterias *E.Coli* químicamente competentes de la cepa Top10 (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific), las cuales fueron sembradas en placas de agar con ampicilina e incubadas a 37°C durante 16 h. Posteriormente, los cultivos de bacterias se procesaron con el método de lisis alcalina para obtener el DNA plasmídico. Finalmente, se ocupó 1 μ L del plásmido purificado para digerirlo con la enzima de restricción *Bgl II*, la cual libera el fragmento de DNA que se ha ligado al vector.

Los productos de digestión -el vector pJET1.2 de 2974 pb y los insertos de los productos de qPCR de 86, 109 y 83 pb- se visualizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Aquellos plásmidos que mostraron el patrón de digestión correcto fueron seleccionados para posteriores caracterizaciones con otras enzimas de restricción: *Afl II*, *Hind III*, *Rsa I*, *Pst I* y *Hae II*; dado que estas presentan sus sitios de restricción en los insertos de cada plásmido. De igual forma, los productos de estas digestiones se visualizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y, solamente, aquellos patrones de digestión correctos fueron seleccionados para la posterior secuenciación automática en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular utilizando el primer comercial T7 y, de esta manera, corroborar su identidad molecular.

6. RESULTADOS

6.1 Estudio de rangos dinámicos para las sondas *Custom TaqMan*[®] de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A*.

Para dar cumplimiento a nuestro primer objetivo, relacionado con la cuantificación de los niveles de expresión de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A*, se diseñaron sondas *Custom TaqMan*[®] (Applied Biosystems) capaces de amplificar específicamente a cada variante. En la **Fig. 9** se muestra el alineamiento múltiple de secuencias de las tres variantes del exón 18 realizado en el programa DNAsis Max; donde se señalan los sitios de unión de los oligonucleótidos (verde: 18A, azul: 18N y rojo: Δ18) y las sondas (amarillo) para cada caso. En dicho alineamiento se ilustra la especificidad esperada en las reacciones de amplificación, dado que la sondas hibridan en regiones nucleotídicas únicas de cada variante.

```

1          21          41          61          81
SCN8A-18A  AAGTGGACAG CCTATGGCTT CGTCAAGTTC TTCACCAATG OCTGGTGTG GCTGGACTTC CTCATTGTGG CTGTCTCTTT AGTCAGCCTT ATAGCTAATG
SCN8A-18N  AAGTGGACAG CCTATGGCTT CGTCAAGTTC TTCACCAATG OCTGGTGTG GCTGGACTTC CTCATTGTGG CTGTACCATT AAA TTTGTCT GCCTTAATTT
SCN8A-Δ18  AAGTGGACAG CCTATGGCTT CGTCAAGTTC TTCACCAATG TGGTGTG GCTGGACTTC CTATTGTGG CTGT.....

101         121         141         161         181
SCN8A-18A  CCCTGGGCTA CGTCAAGTTC TTCACCAATG CCCTTAG GACCCCTAAG GCTTTGAGAC CCTTAAAGC CCTCAAGTTC TTCACCAATG TGGT
SCN8A-18N  AATGGGGA.. ..... .CTTCTGGGA CCTGCAGAGA CTGTAAAGGG CGAGGTTGGT
SCN8A-Δ18  .....

201         221         241         261         281
SCN8A-18A  GGTGAATGCC TTGGTGGGCG CCATCCCCTC CATCATGAAT GTGCTGCTGG TGTGTCTCAT CTTCTGGCTG ATTTTCAGCA TCATGGGAGT TAACTTGTTT
SCN8A-18N  GGTGAATGCC TTGGTGGGCG CCATCCCCTC CATCATGAAT GTGCTGCTGG TGTGTCTCAT CTTCTGGCTG ATTTTCAGCA TCATGGGAGT TAACTTGTTT
SCN8A-Δ18  GGTGAATGCC TTGGTGGGCG CCTC CATCATGAAT GTGCTGCTGG TGTGTCTCAT CTTCTGGCTG ATTTTCAGCA TCATGGGAGT TAACTTGTTT

```

Figura 9. Alineamiento de secuencias de las variantes 18A, 18N y Δ18 del exón 18 del gen *SCN8A*. El alineamiento se realizó utilizando los últimos 71 pb del exón 17, el exón 18 completo y los primeros 172 pb del exón 19 de la secuencia codificante del gen *SCN8A* de humano (GenBank AH007414.2). Los números sobre las secuencias son solo referencia para estimar el tamaño de cada amplicón de cada variante. Los sitios de unión de los *primers* se resaltan en color verde (18A); azul (18N); y rojo (Δ18).

Como siguiente paso, se estudió el intervalo de concentraciones de cDNA en el cual dichas sondas podrían funcionar con mayor eficiencia en la amplificación de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A* en las células HEK-Nav1.6, IMR-32 y HEK-H41. Inicialmente, se procedió a corroborar la presencia de dichas variantes en las células en cuestión con el empleo de los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 2 y utilizando la técnica de PCR estándar. Los productos de estas reacciones fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (**Fig. 10**), obteniéndose: una banda

de aproximadamente 364 pb para las células HEK-Nav1.6, dos bandas de aproximadamente 309 y 244 pb para las células IMR-32 y una banda de aproximadamente 244 pb para las células HEK-H41, correspondiendo a las variantes 18A, 18N- Δ 18 y Δ 18, respectivamente (**Fig. 7**).

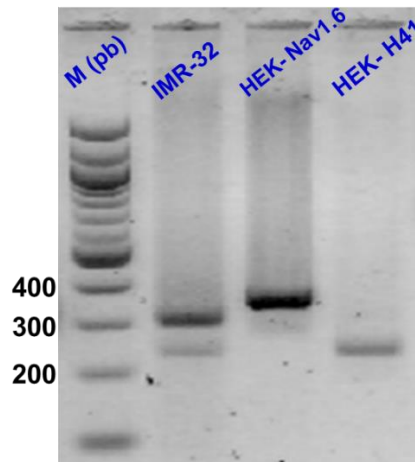


Figura 10. Análisis cualitativo de la expresión de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A*, mediante PCR estándar. Productos de PCR estándar amplificadas a partir del RNA total obtenido de las líneas celulares indicadas. Los amplicones fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. La banda de alrededor de 364 pb obtenida de las células HEK-Nav_v1.6 corresponde a la variante 18A. En las IMR-32 se obtuvieron dos bandas de 244 y 309 pb, aproximadamente, correspondientes a las variantes 18N y Δ 18. Mientras que en las células HEK-H41 se obtuvo una sola banda cercana a los 244 pb que corresponde a la variante Δ 18. El carril marcado como M contiene el marcador de peso molecular de 100 pb.

Una vez comprobada la presencia de las variantes del exón 18 mediante PCR estándar en nuestras células de interés, el siguiente paso fue realizar los experimentos de rangos dinámicos. Se utilizaron las diluciones seriadas de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32 de los cDNAs de las células HEK-Nav_v1.6, IMR-32 y HEK-H41. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes de qPCR, en los que se utilizó 3 μ L de cada dilución por duplicado para cada ensayo de las sondas *Custom TaqMan*[®] (Applied Biosystems) y se mantuvieron invariables el resto de las condiciones experimentales descritas en la metodología de la técnica previamente. En la **Tabla 4**, se muestran los valores de Ct promedio obtenidos para cada dilución analizada, así como las concentraciones de cDNA que fueron estudiadas para cada ensayo. A partir de estos resultados, el promedio

de los valores de Ct y el log de la concentración de cDNA se ajustaron a un modelo de regresión lineal, donde el valor de la pendiente de la recta se sustituyó por S para calcular la eficiencia de cada ensayo a partir de la siguiente ecuación: $E = 10^{\frac{-1}{S}} - 1$. De esta manera, se obtuvo que la eficiencia de cada ensayo en la amplificación de las variantes del exón 18 (18A, 18N, Δ18) con las sondas respectivas fue de 93.5, 94.49 y 102%, respectivamente (**Fig. 11**). Dado que los valores de eficiencia obtenidos fueron mayores al 90% para todos los ensayos, se decidió utilizar la dilución 1:4 del cDNA de cada muestra problema en los experimentos de cuantificación relativa de dichas variantes, mediante la técnica de qPCR.

Tabla 4. Valores de Ct para cada ensayo en función de la [cDNA] empleada

Dilución	[cDNA] ng/ μL	Log [cDNA] ng/ μL	Ct promedio 18A	Ct promedio 18N	Ct promedio Δ18
1:2	25	1.3979	15.86	23.49	24.04
1:4	12.5	1.0969	16.91	23.83	24.91
1:8	6.25	0.7958	17.99	25.28	25.80
1:16	3.125	0.4948	19.09	26.53	26.94
1:32	1.5625	0.1938	20.13	27.38	27.95

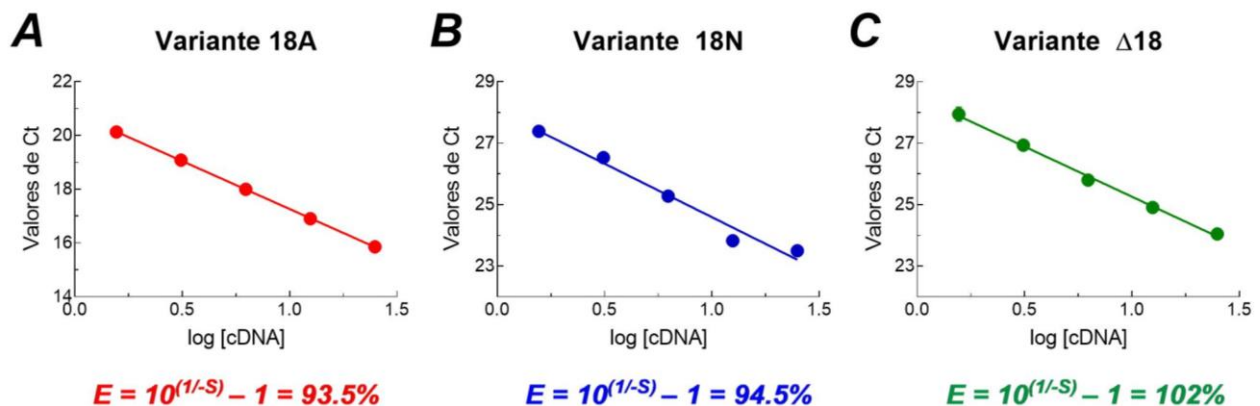


Figura 11. Ajuste al modelo de regresión lineal de los datos obtenidos de los ensayos de rangos dinámicos para las variantes del exón 18 del gen SCN8A. Con el valor de la pendiente del ajuste de los resultados de rangos dinámicos al modelo de regresión lineal, se calculó la eficiencia de las sondas para el rango de diluciones de cDNA estudiado. Los porcentajes de eficiencia correspondientes se indican en la parte inferior de cada gráfico.

6.2 Caracterización de la identidad molecular de los productos de qPCR de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A*.

Con la intención de corroborar la identidad molecular de los productos amplificados con las sondas *Custom TaqMan®*, estos fueron subclonados en el vector pJET1.2/blunt (ver Métodos), posteriormente, una alícuota de 4 µL de la reacción de ligación se utilizó para transformar bacterias *E. coli* químicamente competentes de la cepa Top10. Una vez que los plásmidos fueron amplificados y purificados mediante el método de lisis alcalina, se procedió a su caracterización con enzimas de restricción.

Variante adulta (18A) del gen *SCN8A*

Los plásmidos con el vector pJET1.2 y el producto de qPCR de la variante adulta 18A - amplificado en células HEK-Nav1.6- se denominaron pJET+18Aq y se caracterizaron con las enzimas *Afl II* y *Hind III*. El producto de digestión obtenido con la enzima *Afl II* corresponde a un plásmido linealizado de 3060 pb, ya que esta enzima presenta un único sitio de corte en el nucleótido 52 del inserto. Por otro lado, cuando los plásmidos se someten a la acción conjunta de ambas enzimas de restricción el resultado esperado es la generación de dos bandas de DNA debido a que la enzima *Hind III* presenta también un único sitio de corte en toda la construcción, sin embargo, en este caso el sitio de corte se encuentra en el mismo vector (nucleótido 624). En consecuencia, los productos de digestión con ambas enzimas son de 2773 y 287 pb cuando el inserto se ligó en la misma orientación que la hebra guía del DNA del vector, es decir, se ligó en sentido, este fue el caso de la clona 3. Por el contrario, cuando el inserto se ligó en la orientación opuesta, es decir, en antisentido, se obtienen bandas de 2756 y 304 pb, lo cual se observó en el caso de la clona 1 (**Fig. 12**). Dado que ambas colonias analizadas mostraron los productos de digestión esperados, éstas fueron seleccionadas para corroborar su identidad molecular mediante estudios de secuenciación automática con ayuda del *primer* universal T7.

Las secuencias resultantes se compararon con la reportada en GenBank (AH007414.2) para la variante 18A del exón 18 del gen *SCN8A*, mediante un alineamiento múltiple de secuencia realizado en el programa DNAsis Max, obteniéndose en 100 % de identidad en las secuencias para ambas colonias y corroborándose la orientación en antisentido

(clona 1) y sentido (clona 3) de los insertos (**Fig. 13A y B**, respectivamente). Estos resultados confirman que la sonda *Custom TaqMan*[®] diseñada para la variante 18A amplifica específicamente la región de interés.

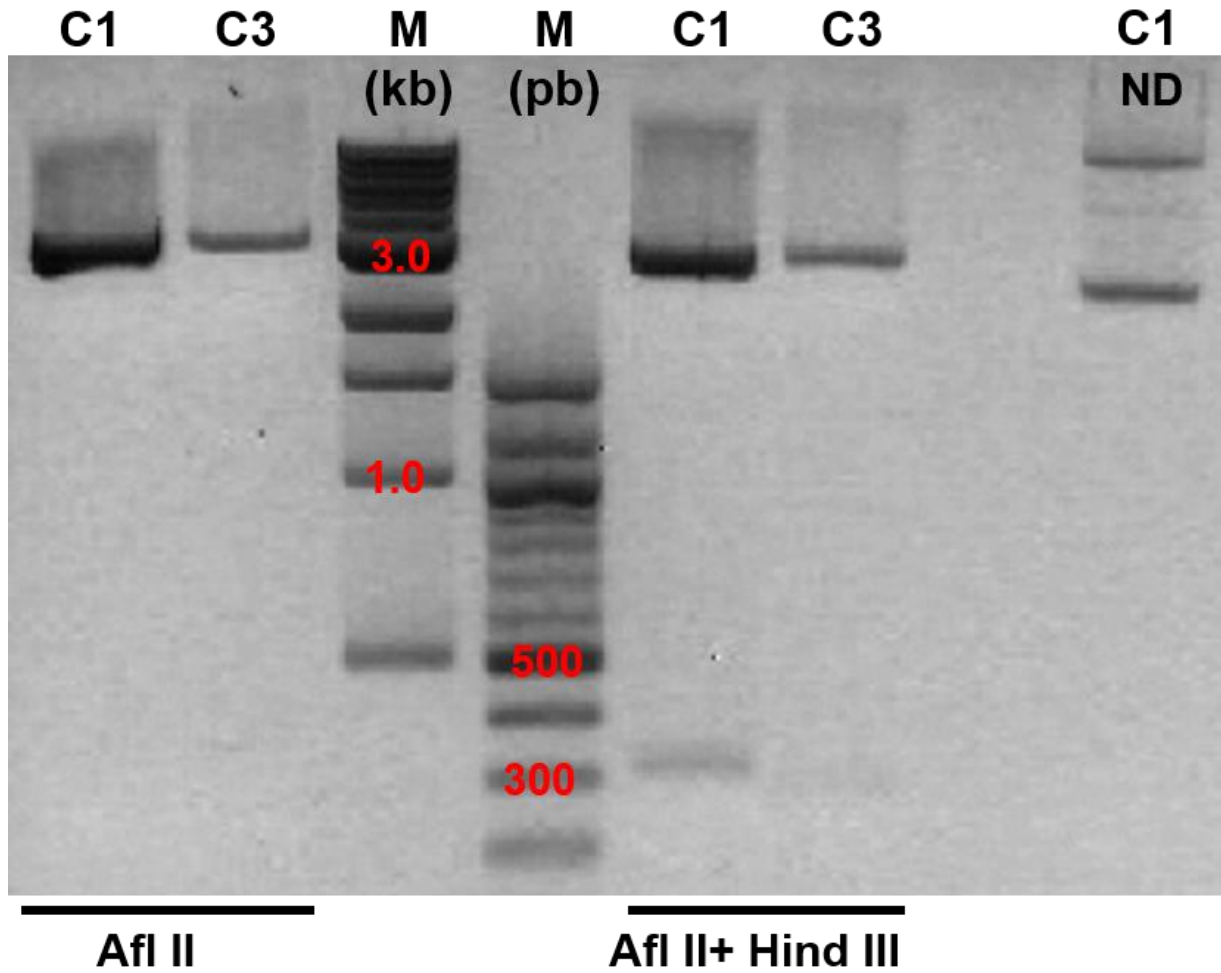


Figura 12. Análisis de restricción enzimática de los plásmidos pJET+18A. El DNA de las clonas 1 y 3 conteniendo el plásmido pJET+18A se sometió a digestión enzimática con la enzima *Afl II* sola y en conjunto con la enzima *Hind III*, tal como se indica con las líneas al pie del gel. Como se esperaba la enzima *Afl II* generó solo una banda de 3060 pb. Por otra parte, la digestión con ambas enzimas produce dos bandas: una de 2773 y otro de 287 pb cuando el inserto se liga en sentido (clona 3; C3); mientras que cuando se liga en antisentido, los tamaños de las bandas esperadas son de 2756 y 304 pb (clona 1; C1). Los carriles marcados con M (kb) y M (pb) contienen los marcadores de peso molecular de 1 kb y 100 pb, respectivamente. En el carril de la extrema derecha se muestra el DNA sin digerir de la clona 1.

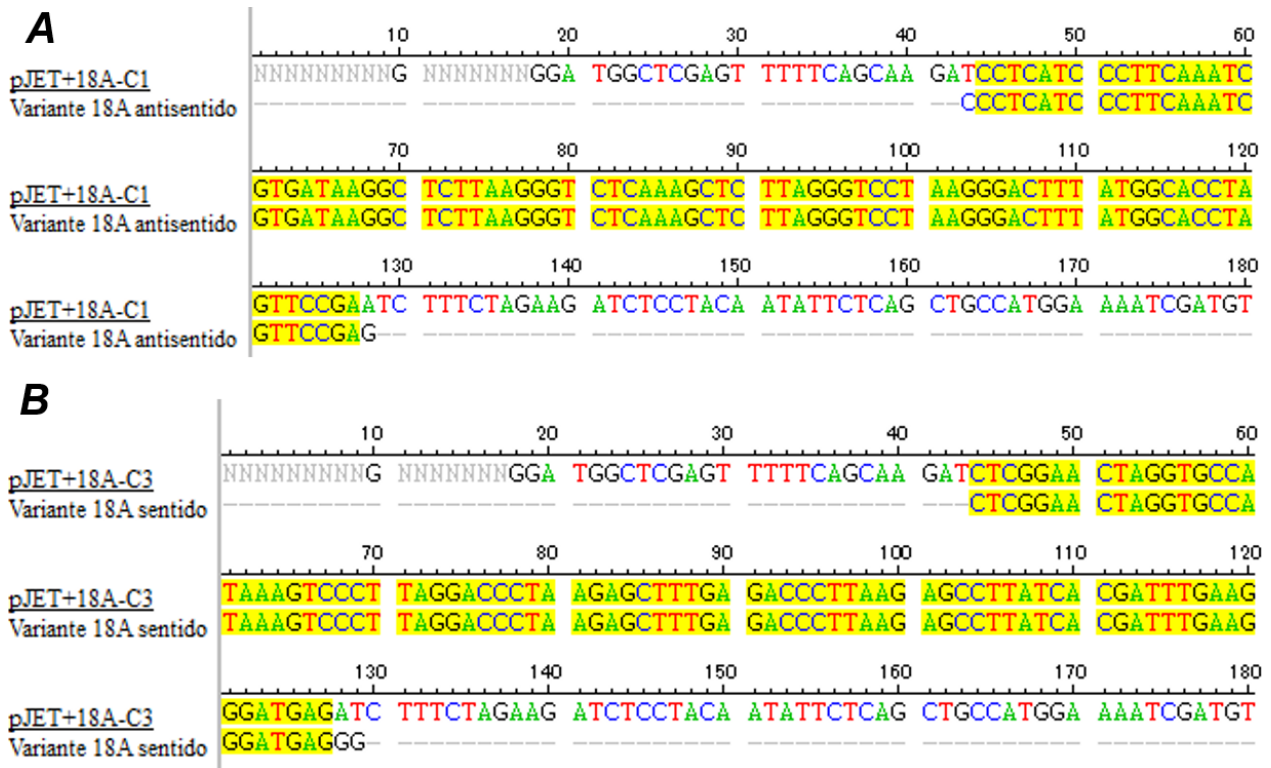


Figura 13. Alineamiento de las secuencias de los plásmidos pJET+18A con la secuencia de la variante 18A del gen *SCN8A*. El DNA de las colonias 1 (A) y 3 (B) previamente caracterizadas por restricción enzimática fueron secuenciados y el alineamiento de estas con la variante 18 del gen *SCN8A* demostró un 100% de identidad entre los insertos de ambas colonias con la secuencia correspondiente a la variante 18A del gen *SCN8A* reportada en Gen Bank (AH007414.2). Nótese que este resultado fue independiente de la orientación en la que se ligaron los productos en el vector pJET: antisentido en el panel A y sentido en el panel B.

Variante neonatal (18N) del gen *SCN8A*

Las construcciones correspondientes al vector pJET1.2 con el producto de qPCR de la variante neonatal 18N -amplificado en células IMR-32- se denominaron pJET+18N y se caracterizaron con las enzimas de restricción *Rsa I* y *Pst I*. En dicha construcción existen dos sitios de restricción para la enzima *Rsa I*: el primero en la posición 2474 del vector y el segundo, en el nucleótido 16 del inserto; de modo que se generan dos productos de digestión con tamaños esperados de 2196 y 887 pb siempre y cuando el inserto se ligue en una orientación en sentido. Asimismo, para la enzima *Pst I* también se presentan dos sitios de corte: el primero en la posición 5 del vector y el segundo, en el nucleótido 62 del inserto; de tal forma que se generan dos productos de digestión cuyos tamaños son de 2655 y 428 pb para cuando el inserto presenta una orientación en sentido. De las cuatro

muestras estudiadas de la variante 18N, solamente los plásmidos correspondientes a las colonias 3 y 6 presentaron el patrón de digestión esperado cuando se caracterizaron con las enzimas *Rsa I* y *Pst I*, respectivamente (**Fig. 14**); por lo que esta clonas se seleccionaron para corroborar su identidad molecular mediante secuenciación automática con ayuda del primer universal T7.

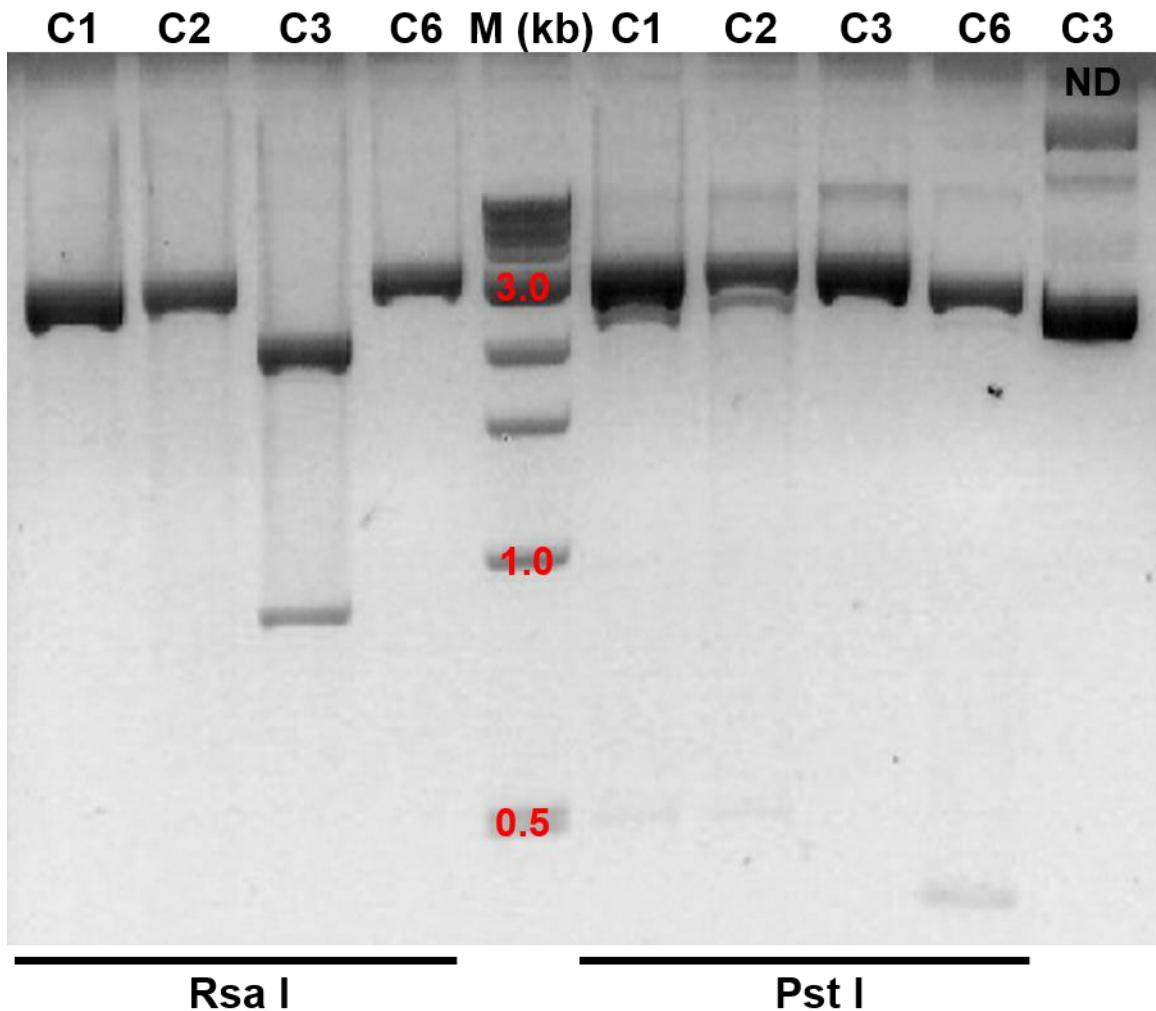


Figura 14. Análisis de los plásmidos pJET+18N con las enzimas de restricción *Rsa I* y *Pst I*. Los productos de digestión esperados con la enzima *Rsa I* cuando el inserto presentó una orientación en sentido, fueron de 2196 y 887 pb; mientras que cuando se utilizó la enzima *Pst I*, los productos de digestión esperados son de 2655 y 428 bp. De las cuatro colonias estudiadas, únicamente los plásmidos correspondientes a las colonias 3 (C3) y 6 (C6) mostraron los patrones de digestión esperados. M (kb), marcador de peso molecular de 1 kb. En el carril de la extrema derecha se muestra el DNA sin digerir de la clona 3.

De manera interesante, en el gel de la **Fig. 14** también se puede observar que cuando el plásmido de la colonia 3 fue caracterizado con la enzima de restricción *Rsa I* se obtuvo el patrón de digestión esperado, pero esto no fue así cuando se caracterizó con la enzima *Pst I*. Un comportamiento similar fue observado con el plásmido de la colonia 6, el cual mostró el patrón de digestión esperado cuando se caracterizó con la enzima de restricción *Pst I*, pero no con la enzima *Rsa I*. Esta aparente contradicción se resolvió con los resultados obtenidos de secuenciación automática de los plásmidos de ambas colonias. Para el caso de la colonia 3, el inserto presente en este plásmido mostró un 100% de identidad en secuencia con los últimos 41 nucleótidos de la secuencia reportada en GenBank (AH007414.2) para la variante 18N del exón 18 del gen *SCN8A* (**Fig. 15A**); mientras que el inserto ligado de la colonia 6 mostró un 100% de identidad en secuencia con los primeros 66 nucleótidos de la misma secuencia (**Fig. 15B**). Para obtener una mejor visualización y comprensión de este fenómeno, se realizó una construcción *in silico*, denominada pJET+18N-C6+C3, donde se fusionaron los insertos presentes en los plásmidos de las colonias 6 y 3. El resultado del alineamiento de esta construcción con la secuencia reportada para la variante 18N del gen *SCN8A*, mostró que, curiosamente, los plásmidos de las colonias 6 y 3 presentan como insertos las secuencias previas y posteriores al codón de paro característico de esta variante en orientación antisentido, respectivamente (**Fig. 15C**).

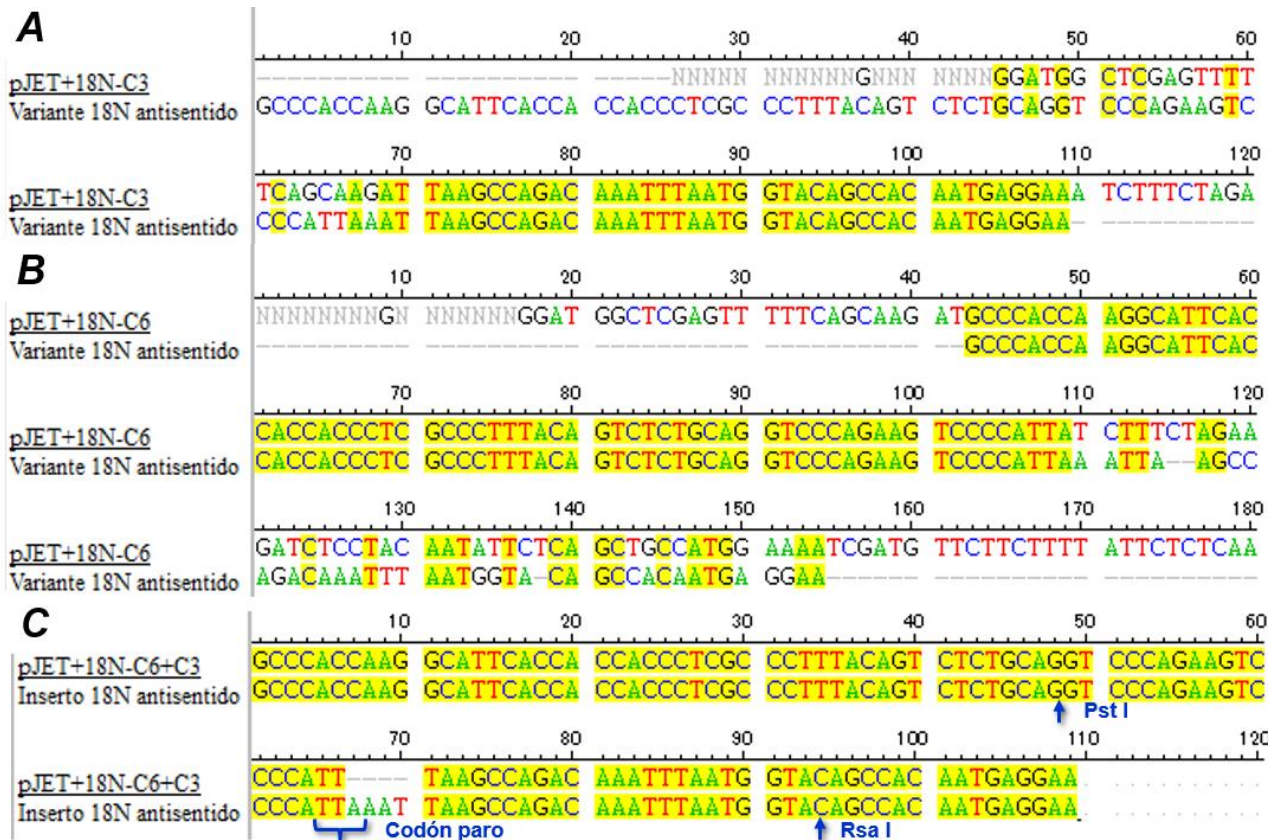


Figura 15. Alineamiento de las secuencias de los plásmidos pJET+18N con la secuencia de la variante 18N del gen *SCN8A*. La secuenciación automática de las clonas 3 y 6 de la variante neonatal del exón 18 confirmaron que los productos de qPCR se ligaron en una orientación antisentido respecto a la del vector pJET2.1, por lo que el alineamiento se realizó utilizando la secuencia antisentido de la variante 18A del gen *SCN8A* reportada en Gen Bank (AH007414.2). Nótese que para el caso de la colonia 3 (**A**), el inserto presente en este plásmido mostró un 100% de identidad con los últimos 41 nucleótidos de la secuencia de la variante 18N el gen *SCN8A* (mostrada en orientación antisentido); mientras que en el de la colonia 6 (**B**), la identidad fue con los primeros 66 nucleótidos de dicha secuencia. En (**C**) se muestra la construcción *in silico* C6+C3-18N, donde se fusionaron los insertos presentes en los plásmidos de las colonias 6 y 3. El alineamiento mostró que los insertos de estas colonias corresponden a las secuencias previas y posteriores al codón de paro característico de la variante 18N en orientación antisentido, respectivamente.

Variante delta ($\Delta 18$) del gen *SCN8A*

Nuestra última construcción representa el vector pJET ligado con el producto de qPCR de la variante delta $\Delta 18$ -amplificado en células HEK-H41-, misma que fue denominada pJET+ $\Delta 18$. En este caso el análisis de restricción enzimática se llevó a cabo con la enzima *Hae II*, para la cual existen tres sitios de corte en la construcción; dos de ellos,

se encuentran dentro del vector en las posiciones 976 y 1346 y el tercero se presenta en el nucleótido 74 del inserto. De aquí que el patrón de digestión esperado fuese de tres bandas con tamaños de 2073, 614 y 370 pb cuando el inserto presentó una orientación en sentido; mientras que con la orientación en antisentido, el tamaño de las bandas esperadas fue de 2008, 678 y 370 pb. De las cinco colonias estudiadas, los plásmidos de las colonias 34 y 50 mostraron los productos de digestión esperados en una orientación en antisentido; mientras que los de las colonias 36, 41 y 52, los mostraron en una orientación en sentido (**Fig. 16**). Por lo que los plásmidos de las colonias 34, 36, 50 y 52 se seleccionaron para corroborar su identidad molecular mediante secuenciación automática utilizando para ello el *primer* T7.

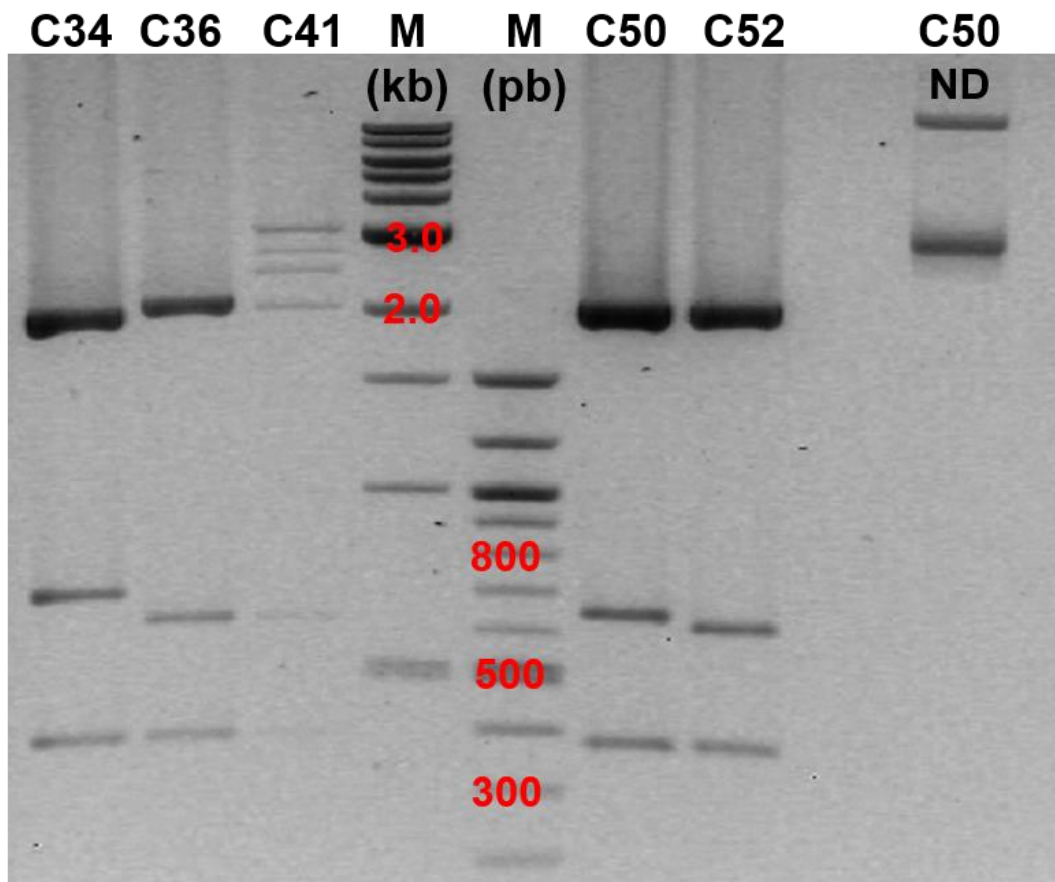


Figura 16. Análisis de los plásmidos pJET+Δ18 con la enzima de restricción *Hae II*. El análisis de restricción enzimática del DNA de las colonias 34 y 50 mostraron el patrón de digestión esperado con el inserto en una orientación en antisentido (2073, 614 y 370 pb), y el de las colonias 36, 41 y 52 con el inserto en sentido (2008, 678 y 370 pb). M (kb) y M (pb), marcadores de peso molecular de 1 kb y 100 pb, respectivamente. En el carril de la extrema derecha se muestra el DNA sin digerir de la clona 50.

Los resultados de las secuencias de los plásmidos de cada colonia se compararon con la reportada en el GenBank (AH007414.2) para la variante $\Delta 18$ del gen *SCN8A* y los resultados se muestran en los alineamientos de la Fig. 17. De esta forma, se observó un 100% de identidad de los insertos de las colonias 34 y 36 con la secuencia correspondiente a la variante $\Delta 18$, lo cual corroboró también la orientación en antisentido y sentido de los respectivos insertos (**Fig. 17A y B**). Sin embargo, la secuencia obtenida del inserto de la colonia 50 evidenció la presencia de solo 48 nucleótidos que se distribuyeron en los extremos de la secuencia reportada (22 y 16 nucleótidos, respectivamente) en una orientación en antisentido. No obstante, la identidad fue también de 100% (**Fig. 17C**); mientras que el inserto de la clona 52 mostró el mismo porcentaje de identidad únicamente con los últimos 16 nucleótidos de la secuencia reportada -en una orientación en sentido- (**Fig. 17D**).

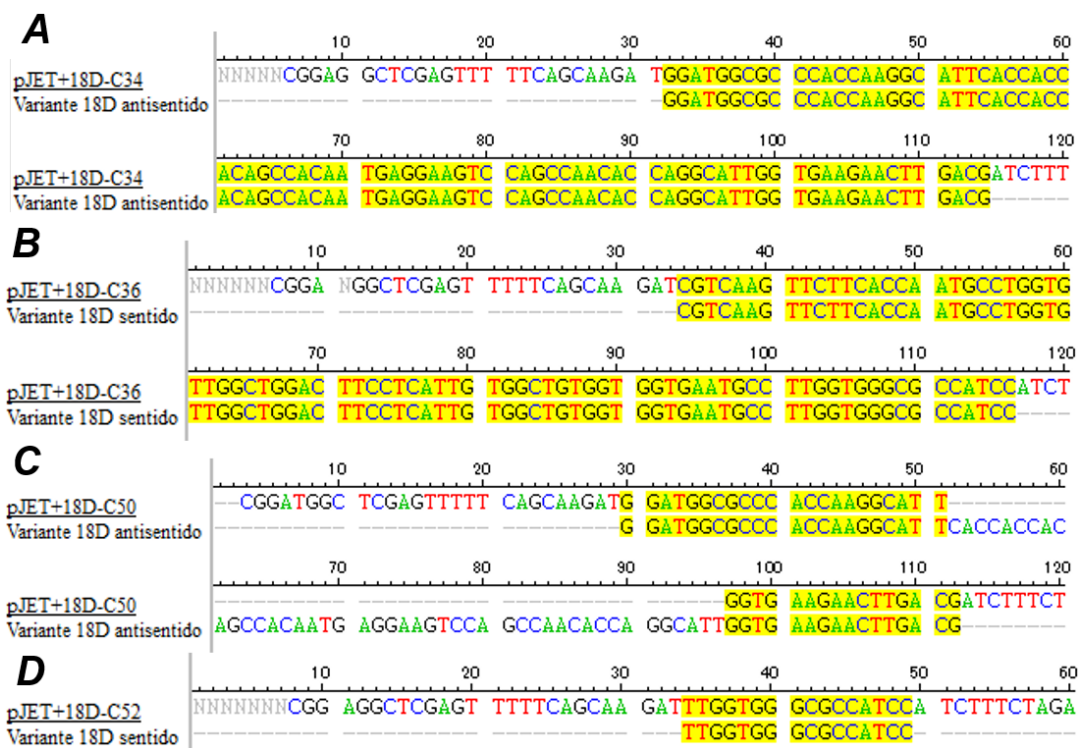


Figura 17. Alineamiento de las secuencias de los plásmidos pJET+ $\Delta 18$ y la secuencia de la variante $\Delta 18$ del gen *SCN8A*. A, B) La secuencia del DNA de las colonias 34 y 36 mostró un inserto de 83 pb, el cual coincide con la longitud esperada para la variante $\Delta 18$, y la identidad fue del 100%. La secuenciación permitió corroborar, además, la orientación de estos insertos. C, D) Los insertos de las colonias 50 y 52, por el contrario, fueron incompletos de solo 38 y 16 pb, respectivamente. Sin embargo, la identidad de los insertos incompletos fue del 100% con la variante $\Delta 18$ en una orientación en antisentido (colonia 50) y en sentido (colonia 52).

Finalmente, con la intención de investigar la causa de los fragmentos incompletos obtenidos en la secuenciación de los insertos de la mutante $\Delta 18$ principalmente (**Fig. 17C y D**), se realizó un análisis electroforético de los productos de qPCR de las diferentes variantes del exón 18 del gen *SCN8A* de las líneas de CaCu y de neuroblastoma. Los resultados se presentan en la **Fig. 18**. Una alícuota de 10 μ l de los tubos de reacción de la qPCR fueron cargados directamente en un gel de agarosa al 2% y se separaron por electroforesis. Debido a que conforme avanza la separación de los fragmentos de qPCR la intensidad de las bandas tiende a disminuir, la separación de los productos de qPCR se documentó mediante fotografías obtenidas a los 5 y 10 min de iniciada la electroforesis, con la intención de obtener una mejor visualización de las bandas en cuestión. Las imágenes demuestran la presencia de los productos de qPCR del tamaño esperado para cada una de las variantes del gen 18 de *SCN8A*. En el caso de las variantes 18A y 18N se aprecian las bandas esperadas de 86 y 109 pb, en todas las líneas celulares estudiadas. De manera interesante, para la variante $\Delta 18$ se aprecian dos bandas de DNA: una, correspondiente a los 83 pb del producto esperado; y otra, de un tamaño aproximado de 150 pb. De igual manera, estas dos bandas se observaron en todas las líneas celulares estudiadas. Estos resultados confirman la amplificación de los productos de qPCR esperados para cada variante del exón 18 de *SCN8A*, por lo que la presencia de los fragmentos más pequeños obtenidos con los estudios de secuenciación podría deberse a modificaciones realizadas por las bacterias en el proceso de transformación-amplificación de dichos DNAs, las cuales se revisarán con más detalle en la sección de Discusión.

En relación con la banda de 150 pb observada en los productos de qPCR de la variante $\Delta 18$, se requiere realizar más ensayos de clonación molecular donde se logren transformar bacterias con el plásmido que presente como inserto a este producto para conocer con exactitud la identidad molecular del mismo.

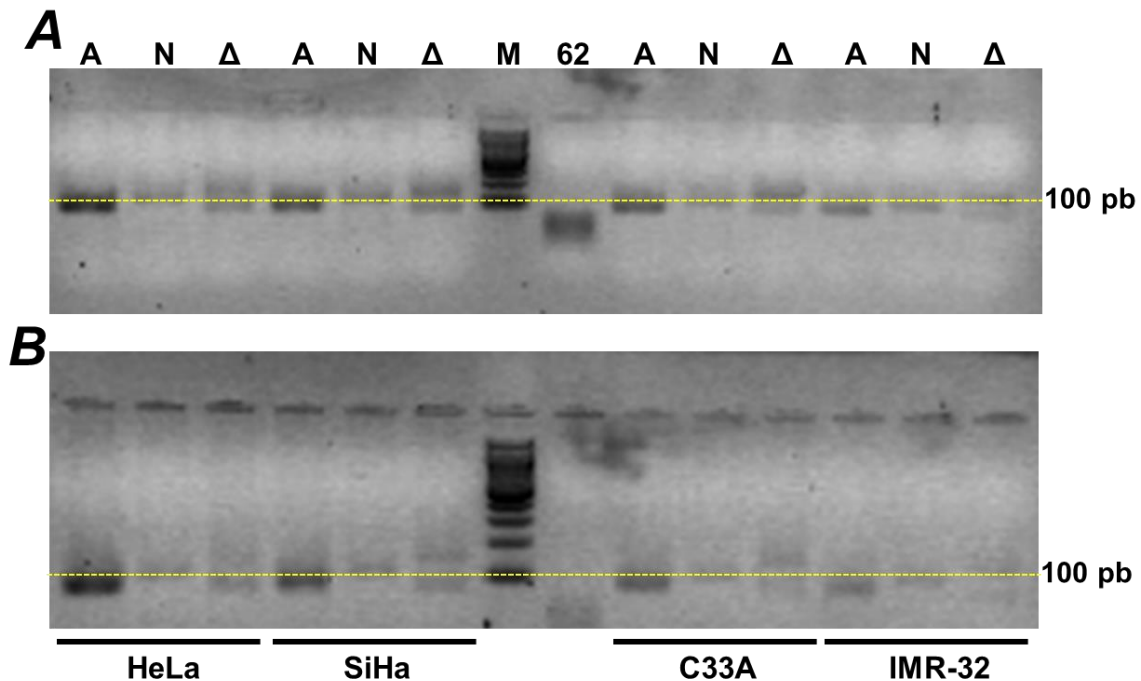


Figura 18. Productos de amplificación por qPCR de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A* de líneas celulares de CaCu y neuroblastoma. Fotografías de un gel de agarosa al 2% documentadas a los 5 (A) y 10 min (B) después de iniciada la electroforesis. Se muestran los productos de qPCR de las tres variantes del exón 18: A, adulta; N, neonatal; y Δ , delta; en las líneas celulares indicadas. Se observa las bandas esperadas de 86 y 109 pb para las variantes 18A y 18N. En el caso de la variante Δ 18, además del producto esperado de 83 pb, también se distingue una segunda banda de un tamaño aproximado de 150 pb. Como un segundo marcador de tamaño molecular, en el carril etiquetado con el número 62 se colocó una alícuota de un *primer* de tamaño conocido de 62 pb. M, marcador de 100 pb. Para una mejor visualización de los tamaños de los productos de qPCR, la línea punteada amarilla indica el corrimiento de la banda de 100 pb.

En resumen, en esta primera sección de resultados se demuestra que las sondas *Custom TaqMan* de Applied Biosystems muestran una eficiencia superior al 93% para cuantificar los niveles de las diferentes variantes del exón 18 del gen *SCN8A* y que las secuencias de los productos de qPCR amplificados corresponden en un 100% con las secuencias respectivas reportadas en el GenBank (AH007414.2). La observación de que algunos insertos de los productos de qPCR ligados y secuenciados en el vector pJET2.1 mostraran secuencias incompletas resulto un tanto inesperada, aunque trabajos previos de otros grupos de investigación han reportado este tipo de alteraciones en las secuencias de canales Nav.

6.3 Análisis cuantitativo de los niveles de expresión del mRNA de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A* en líneas celulares de CaCu.

Una vez establecido el rango de concentraciones en las cuales las sondas *Custom TaqMan*[®] muestran la mejor eficiencia y habiendo constatado la especificidad en la amplificación de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A*, el siguiente objetivo consistió en cuantificar sus niveles de expresión relativos en las líneas celulares de CaCu, así como en las células de neuroblastoma (IMR-32) y en la línea celular HEK-Nav1.6. En total se realizaron tres experimentos independientes de qPCR a partir de las diluciones 1:4 de los cDNA de cada una de las muestras a estudiar, siguiendo la metodología descrita para los rangos dinámicos de las sondas en cuestión (**Tabla 3**).

Al igual que en los ensayos de rangos dinámicos, una vez finalizada la reacción de qPCR se fijó el nivel umbral para cada ensayo y se obtuvo el valor de Ct de cada reacción con ayuda del software del equipo. De este modo, el programa proporcionó los valores promedio de Ct así como de la desviación estándar de cada triplicado. Es importante recordar que el valor de Ct es inversamente proporcional al nivel de expresión relativo de cada gen. En los casos necesarios, los cambios en los niveles de expresión de las variantes con respecto a la muestra seleccionada como control fueron cuantificados mediante del método de $2^{-\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). En la **Fig. 19** se muestra el gráfico obtenido al llevar a cabo la reacción de qPCR para las diferentes variantes del exón 18 de *SCN8A* en las células de CaCu y neuroblastoma.

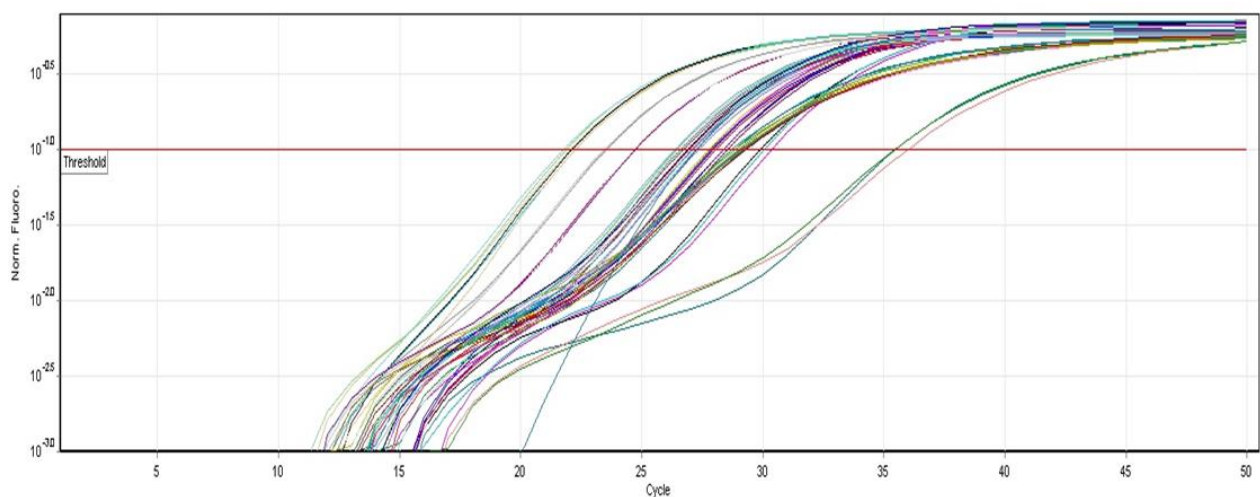


Figura 19. PCR en Tiempo Real (qPCR) para las variantes del exón 18 del gen *SCN8A* en las líneas celulares de CaCu y neuroblastoma. Las reacciones se prepararon por triplicado como se describe en el texto. Cada uno de los triplicados se observa como una línea de color continua que muestra el incremento en la fluorescencia debido a la acumulación del amplicón en cuestión respecto al ciclo de la reacción, desde los niveles más bajos de la señal de fluorescencia hasta alcanzar una fase estacionaria (parte superior de la gráfica). Conforme avanza la reacción, el programa SDS 1.2.2 acoplado al detector del equipo, calculó el valor específico de emisión de fluorescencia para cada ciclo mediante la siguiente ecuación: $\Delta Rn = Rn_+ - Rn_-$, donde Rn_+ representa la fluorescencia de cada punto, mientras que Rn_- representa la fluorescencia basal medida con la sonda pasiva ROX (6-carboxi-X-rodamina). La línea roja horizontal indica el umbral elegido para determinar los valores de Ct de cada reacción.

En la **Tabla 5** se presenta un resumen de los valores de Ct obtenidos para los diferentes genes estudiados en el presente trabajo. Los valores de Ct obtenidos para la variante 18A en las líneas celulares SiHa, C33A e IMR-32, fueron de aproximadamente 26. Para el caso de la línea celular HeLa, el valor de Ct fue de los más altos, alrededor de 29; lo cual sugiere que, dentro de todas las muestras estudiadas, esta última presentó los niveles más bajos de expresión del mRNA de la variante adulta (**Fig. 20A**). Sin embargo, tanto para las células de CaCu como para las de neuroblastoma, la expresión de dicha variante se ubica dentro de la categoría de expresión moderada, dado que los valores de Ct se encuentran dentro del rango 26-30.

Para la variante 18N, se obtuvieron valores de Ct cercanos a 27 en las líneas celulares SiHa, C33A e IMR-32, por lo que la expresión de dicha variante en estas muestras también se considera como moderada. No obstante, para la línea celular HeLa el valor de Ct obtenido fue el más alto en todos los ensayos de qPCR: alrededor de 34, lo cual

hace referencia a los niveles de expresión más bajos de esta variante entre todas las muestras estudiadas y ubicándose dentro de la categoría de bajo nivel de expresión **(Fig. 20B)**.

Para el caso de la variante $\Delta 18$, los valores de Ct observados en las líneas celulares SiHa, C33A e IMR-32 estuvieron próximos a 28, mostrando un nivel de expresión moderado del mRNA de esta variante; mientras que, para la línea celular HeLa se obtuvo un valor cercano a 35, siendo estas células las que presentaron un menor nivel de expresión de esta variante y ubicándose dentro de la categoría de baja expresión **(Fig. 20C)**.

De manera adicional, y tomando ventaja del ensayo de qPCR específico para la variante 5A que ya reportamos previamente en nuestro laboratorio (Hernandez-Plata et al, 2012), se evaluó la expresión relativa de esta variante como una medida indirecta de los niveles de expresión de la variante 18A, pues como ya se explicó en el alineamiento de la Fig. 8, la presencia de esta última variante se asegura con la expresión de la 5A. Por lo tanto, el empleo de esta sonda sirvió como control adicional de la amplificación de la variante 18A en las muestras de estudio. Los valores de Ct obtenidos para esta variante fueron de 27 en las líneas celulares IMR-32, SiHa y C33A; y de 28 en las células HeLa; es decir, valores de Ct dentro del intervalo considerado para genes de expresión moderada **(Fig. 20D)**.

Finalmente, los niveles de expresión del gen seleccionado como control interno, el gen constitutivo HPRT-1, se ubicaron en el intervalo de genes de alta expresión. En las líneas celulares de CaCu, la abundancia relativa de este gen se mantuvo prácticamente constante, con valores de 20, 21 y 22 para las células HeLa, C33A y SiHa, respectivamente. Mientras que en la línea celular IMR-32 el valor de Ct observado para HPRT-1 fue cercano a 25, siendo igualmente indicativo de una alta expresión génica **(Fig. 20E)**. La diferencia de estos valores de Ct del gen HPRT-1 entre las células de CaCu y de neuroblastoma, se ubican dentro de una variación mínima observado con genes constitutivos en las diversas situaciones de cáncer y tejidos no cancerosos (Kok et al., 2005; Mcneill et al., 2007; Martino et al., 2011). Por otra parte, conforme a lo esperado, la línea celular Hek-Nav1.6 mostró valores de Ct para ambas variantes

adultas, 5A y 18A, en el intervalo de genes de alta expresión: 17 para ambos ensayos; confirmando así, la sobre expresión de la isoforma adulta del canal Nav1.6 (**Tabla 5; Fig. 20A y D**). Asimismo, los niveles del gen constitutivo HPRT-1 en estas células fueron similares a los detectados en las células de CaCu (**Fig. 20E**).

Tabla 5. Valores de Ct promedio obtenidos de los ensayos de qPCR.

Línea celular	18A	18N	$\Delta 18$	5A	HPRT
SiHa	26.7	27.1	28.0	27.0	22.3
HeLa	29.0	33.5	34.8	28.2	20.4
C33A	26.6	26.7	28.5	27.0	21.3
IMR-32	26.4	27.8	29.1	27.0	24.7
HEK-Nav1.6	17.2	NC	NC	16.9	20.1

Los valores de Ct son el promedio de los datos obtenidos a partir de los tres experimentos realizados para cada línea celular de CaCu y de un experimento para las células IMR-32 y Hek-Nav1.6. En cada experimento los ensayos de qPCR se realizaron por triplicado. NC, gen no cuantificado.

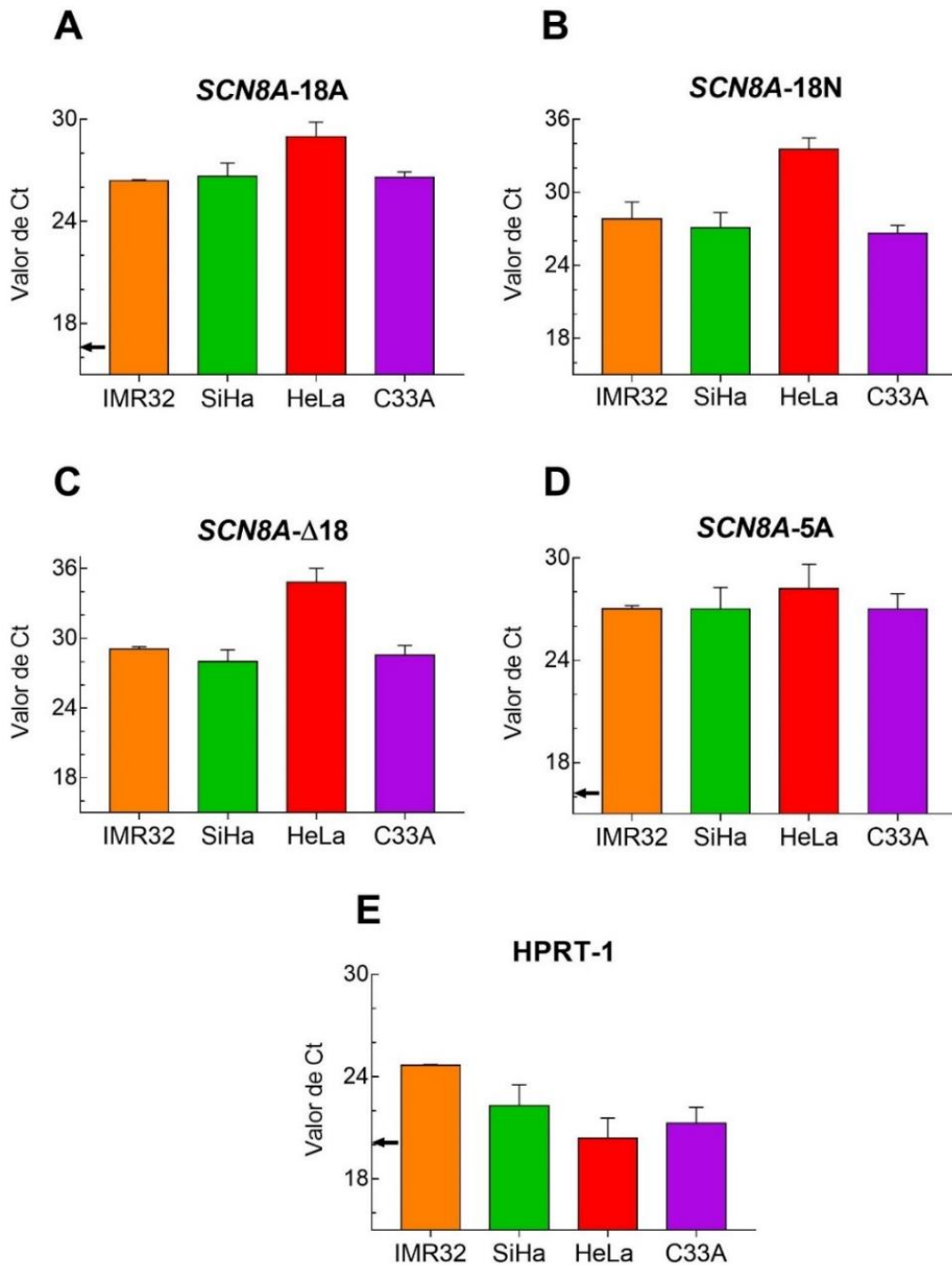


Figura 20. Expresión diferencial de las variantes del gen *SCN8A* y de *HPRT-1* en células de CaCu y neuroblastoma. En cada panel se grafican los valores promedio de Ct \pm la desviación estándar que presentaron los genes cuantificados por triplicado en tres experimentos independientes de qPCR para cada una de las líneas celulares indicadas. Nótese que las células HeLa presentaron los valores de Ct más altos, es decir, los niveles de expresión más bajos de todas las variantes estudiadas del gen *SCN8A*, respecto al resto de las líneas celulares estudiadas. Las flechas negras en los paneles **A**, **D** y **E** indican el valor de Ct observado en las células Hek-Nav1.6 para los genes respectivos. 18A, 18N, y Δ 18 variantes del exón 18 del gen *SCN8A*; 5A, variante adulta del exón 5 del mismo gen.

Una vez conocidos los valores de Ct para cada una de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A* tanto en las líneas celulares de CaCu como en la de neuroblastoma, se procedió a evaluar la expresión relativa de cada variante en las muestras de interés con respecto a aquella seleccionada como control. Considerando que la eficiencia de la reacción de qPCR en cada ensayo (**Fig. 11**) fue mayor al 90% y menor al 110%, entonces es posible realizar la comparación de la abundancia relativa de la expresión de cada uno de los genes mediante el método de $2^{-\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Primeramente, estudiamos el comportamiento de los niveles de expresión de dichas variantes en células de CaCu positivas al VPH-16 (SiHa) y VPH-18 (HeLa) respecto a células de CaCu negativas a VPH (C33A). Los datos correspondientes a dicho análisis se muestran en la **Tabla 6** y se grafican en la **Fig. 21**. Para el caso de la variante adulta, se obtuvieron niveles de expresión similares entre las células SiHa y C33A; mientras que las células HeLa mostraron niveles de expresión que fueron 4.5 veces más bajos con respecto a las células C33A y 4.3 veces inferior que los de las células SiHa (**Fig. 21A**). Por lo que respecta a la variante neonatal, se observó que en las células SiHa esta variante se expresa 25% menos que las células control C33A; mientras que para las células HeLa el nivel de expresión fue prácticamente nulo respecto al control: menos del 2% del total de mRNA detectado en las células C33A (**Fig. 21B**).

Por otro lado, la expresión relativa de la variante $\Delta 18$ fue más abundante en las células SiHa que en las células C33A (aproximadamente 1.5 veces más); sin embargo, el nivel de expresión en las HeLa fue nuevamente despreciable respecto al control (**Fig. 21C**). La comparación directa entre células SiHa y células HeLa indica que el nivel de expresión de la variante $\Delta 18$ es 130 veces más alto en las células SiHa (positivas al VPH-16). Finalmente, los niveles de expresión de la variante 5A del gen *SCN8A* mostraron una tendencia bastante similar al de la variante 18A (**Fig. 21D**, comparar con Fig. 21A), lo que es consistente con la aseveración de que los niveles de expresión de la variante 5A es una medida indirecta de la expresión de la variante 18A del gen *SCN8A*.

Tabla 6. Cálculo de los niveles de expresión de las variantes del gen *SCN8A* en las líneas celulares SiHa y HeLa respecto a las células C33A.

Gen	Valores de Ct			ΔCt (CaCu - Control)		$2^{-\Delta Ct}$	
	Control C33A	CaCu HeLa	CaCu SiHa	HeLa	SiHa	$2^{-\Delta Ct}$ HeLa	$2^{-\Delta Ct}$ SiHa
18A	26.60	28.98	26.65	2.39	0.056	0.191	0.962
18N	26.65	33.54	27.12	6.89	0.470	0.008	0.722
$\Delta 18$	28.54	34.83	28.00	6.28	-0.542	0.013	1.456
5A	27.02	28.22	27.01	1.20	-0.003	0.434	1.002

Los valores de Ct son el promedio de los datos obtenidos a partir de los tres experimentos independientes realizados con cada una de las líneas celulares indicadas (mismos datos que la Tabla 5). Los datos de la columna de la extrema derecha representan el número de veces que cambio la cantidad de mRNA de cada uno de los genes en las muestras de CaCu positivas a VPH (HeLa y SiHa) respecto al grupo Control (C33A) calculado por el método $2^{-\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

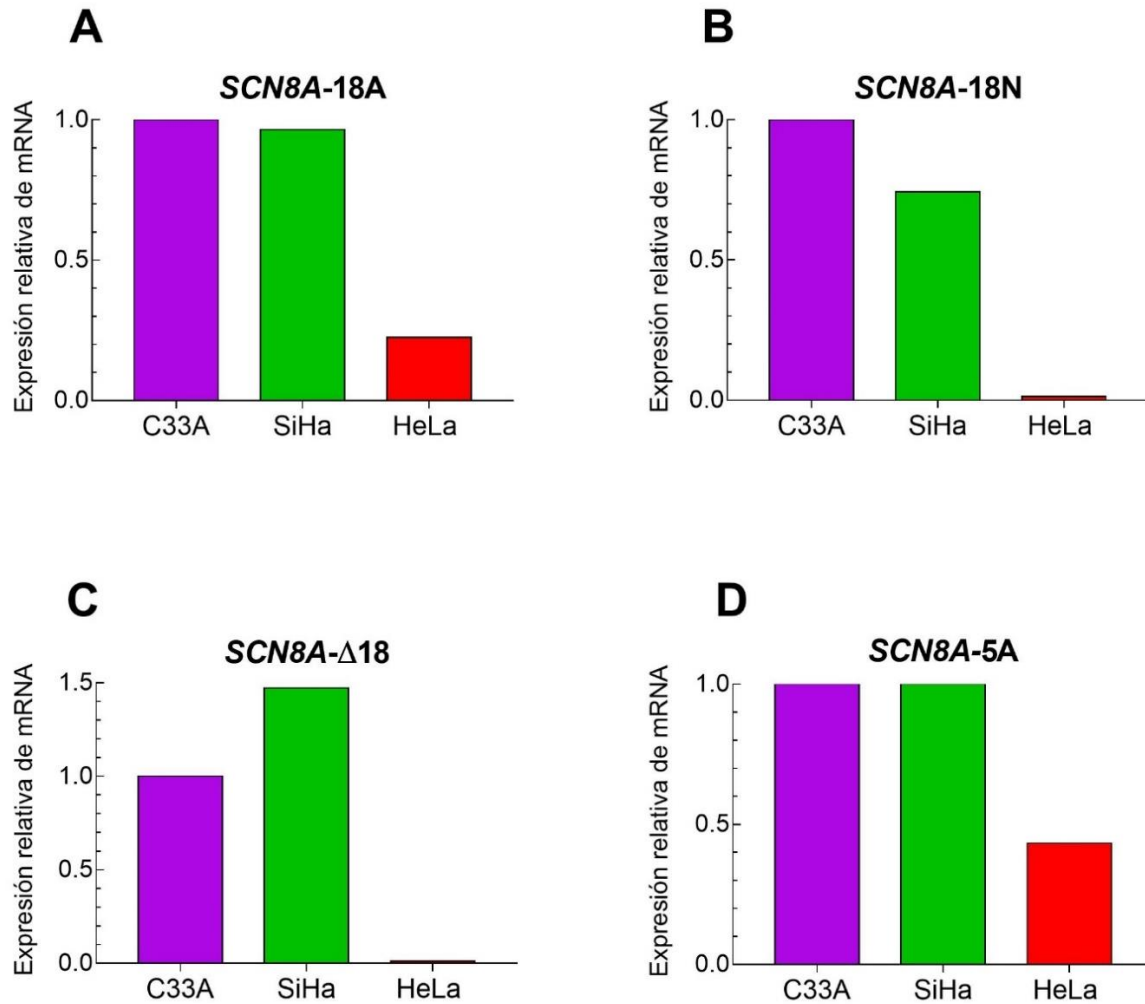


Figura 21. Expresión relativa de las variantes del gen *SCN8A* en las líneas celulares de CaCu positivas y negativas al VPH. Cambios en los niveles de mRNA (en número de veces) de las variantes del gen *SCN8A* en las células positivas al VPH-16 (SiHa) o al VPH-18 (HeLa) respecto a las células negativas a VPH (C33A). Los valores se obtuvieron como se describe en la Tabla 6. Nótese que la expresión relativa de las variantes 18N y Δ 18 en las células HeLa es prácticamente nula respecto a las células C33A, mientras que los niveles de las variantes adultas (18A y 5A) son sustancialmente más altos. Por el contrario, las células SiHa presentan niveles de mRNA de la variante Δ 18 más altos que las mismas células control. Resultados de 3 experimentos independientes cada uno de ellos por triplicado.

En un segundo análisis de la expresión génica de las diferentes variantes del gen *SCN8A*, se utilizó la línea celular de neuroblastoma (IMR-32) como muestra control. Este análisis proporcionó una comparación entre los niveles de expresión de dichas variantes en el CaCu y los cuantificados en células de origen neuronal (neuroblastoma) donde el canal Nav1.6 se expresa de manera ordinaria para desempeñar su papel en la

excitabilidad celular. Los datos de este análisis se presentan de manera resumida en la **Tabla 7** y en la **Fig. 22**. En este caso, las células SiHa y C33A mostraron niveles de expresión muy similares para las variantes adultas del gen *SCN8A*, mismos que significaron aproximadamente 15% menos en relación con los detectados en las células IMR-32. Nuevamente, las células HeLa expresaron niveles de mRNA claramente inferiores a los observados en células SiHa, C33A y en las células control IMR-32 (**Fig. 22A y D**). Notablemente, estos niveles de expresión de las variantes adultas en las células HeLa son sustancialmente más altos cuando se comparan con las células IMR-32 que cuando la comparación es con las células C33A (**Fig. 21 A y D**). Por su parte, la variante neonatal (18N) presentó niveles de expresión más altos en las células SiHa y C33A (1.6 y 2.1 veces, respectivamente) respecto a las células de neuroblastoma; mientras que la expresión de esta variante en las células HeLa fue prácticamente nula respecto al control (**Fig. 22B**). Esta misma tendencia se observa para los niveles relativos de mRNA de la variante $\Delta 18$, cuya expresión mostró un aumento en las células SiHa y C33A de 2.1 y 1.5 veces, respectivamente; mientras que la expresión en las células HeLa fue de igual manera raquíutica respecto a las células IMR-32 (**Fig. 22C**).

Tabla 7. Cálculo de los niveles de expresión de las variantes del gen *SCN8A* en las líneas celulares de CaCu respecto a las células de neuroblastoma.

Gen	Valores de Ct				ΔCt (CaCu - Control)			$2^{-\Delta Ct}$		
	Control IMR-32	CaCu HeLa	CaCu SiHa	CaCu C33A	HeLa	SiHa	C33A	HeLa	SiHa	C33A
18A	26.39	28.98	26.65	26.60	2.59	0.261	0.205	0.166	0.835	0.868
18N	27.81	33.54	27.12	26.65	5.78	-0.693	-1.163	0.019	1.617	2.239
18D	29.06	34.83	28.00	28.54	5.79	-1.061	-0.519	0.018	2.086	1.433
5A	27.04	28.22	27.01	27.02	1.18	-0.023	-0.020	0.440	1.016	1.014

Los valores de Ct son los mismos datos que la Tabla 5. Los datos de la columna de la extrema derecha representan el número de veces que cambio la cantidad de mRNA de cada uno de los genes en las muestras de CaCu (HeLa, SiHa y C33A) respecto al grupo Control (IMR-32) calculado por el método $2^{-\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

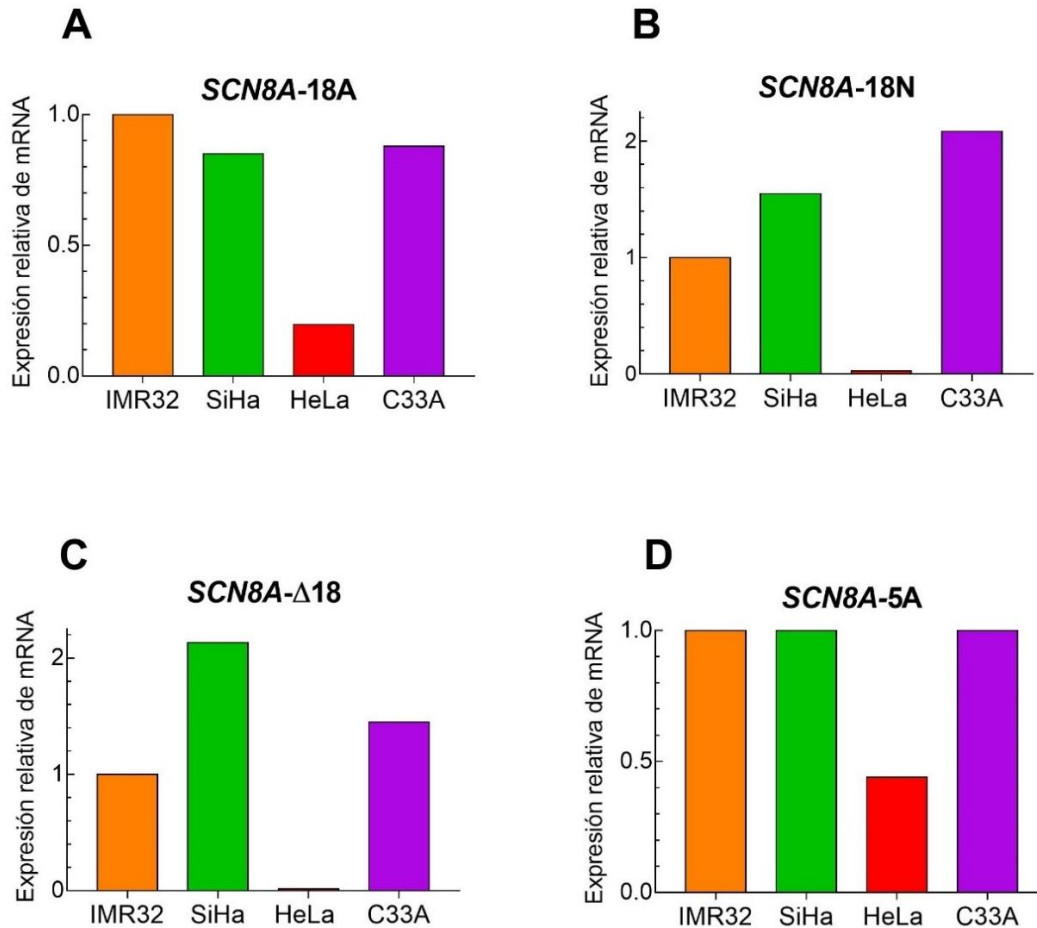


Figura 22. Expresión relativa de las variantes del gen *SCN8A* en las líneas celulares de CaCu respecto a la línea celular de neuroblastoma IMR-32. Cambios en los niveles de mRNA (en número de veces) de las variantes del gen *SCN8A* en las células de CaCu: SiHa, HeLa y C33A, respecto a las células de origen neuronal IMR-32. Los valores graficados se obtuvieron de la Tabla 7. Es evidente que las células HeLa presenta los niveles de expresión más bajos de las variantes del gen *SCN8A* cuando se compara con cualquier otro tipo celular de los aquí estudiados.

Debido a las condiciones de pandemia por el virus SARS-CoV-2 en las que nos encontramos desde hace un año, el presente proyecto de investigación se vio seriamente afectado, no siendo posible dar cumplimiento al segundo objetivo de la presente disertación. Por esta razón, mi proyecto de doctorado representa una continuidad del presente trabajo de maestría; en el cual se trabajará para dar respuesta a las interrogantes que saltan de la presente investigación, principalmente a la participación de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A* en las capacidades metastásicas de líneas celulares de CaCu.

7. DISCUSIÓN

Los canales de sodio activados por voltaje (Nav) son proteínas transmembranales que han sido canónicamente asociados a la generación y propagación de potenciales de acción en células excitables, tales como neuronas, cardiomiocitos y músculo esquelético. Sin embargo, en las últimas dos décadas, la expresión aumentada de los canales Nav en varios tipos de cáncer ha sido extensamente reportado. Para citar solo algunos ejemplos, se ha demostrado la expresión abundante del canal Nav1.5 en líneas celulares de cáncer de mama (Fraser et al., 2005); el canal Nav1.7 en cáncer gástrico (Xia et al., 2016) y el canal Nav1.6, en cáncer cervical (Hernandez-Plata et al., 2012). En estas células, los canales Nav participan en funciones celulares que se relacionan con la migración, acidificación endosomal, fagocitosis, formación de podosoma, liberación de insulina y de citocinas, proliferación e invasividad (Besson et al., 2015) (Patel & Brackenbury, 2015) (Eren et al., 2015).

Particularmente, en el CaCu se ha observado que el canal Nav1.6 es sobre expresado alrededor de 40 veces más en muestras de CaCu positivas a VPH-16 que en muestras no cancerosas. Tal sobre expresión es específica para el canal Nav1.6, ya que también se reportó la presencia de las subunidades Nav1.1, 1.2, 1.3 y 1.7 en las células de cérvix, pero estas no sufrieron mayores cambios con la aparición del fenómeno canceroso (Hernandez-Plata et al., 2012). Además, en el mismo trabajo se demostró que dicha isoforma presenta una contribución directa en la capacidad invasiva de células de CaCu.

Desde 1997 se conoce la presencia de tres variantes del procesamiento alternativo del exón 18 del gen *SCN8A*, el cual codifica para la isoforma Nav1.6 de los canales de sodio activados por voltaje (Plummer et al., 1997). La primera corresponde a la variante adulta (18A), y contiene el transcrito completo del gen *SCN8A*, y se expresa funcionalmente en la membrana plasmática de la mayoría de las neuronas (Burbidge et al., 2002). Las restantes se denominan neonatal (18N) y delta (Δ 18), donde para la primera se genera una proteína no funcional truncada de solo dos dominios y, en el caso de la segunda, se produce una proteína funcional que carece de un tercio del dominio III dada la ausencia del exón 18 (Plummer et al., 1997). De gran interés para el presente trabajo de

investigación, se ha reportado que la variante $\Delta 18$ se encuentra expresada en vesículas intracelulares regulando el proceso de invasividad celular de macrófagos y células de melanoma (Carrithers et al., 2009).

7.1 Expresión de variantes del exón 18 del gen *SCN8A* en líneas celulares de CaCu: caracterización molecular.

Teniendo en cuenta los antecedentes de la sección anterior, aunado a observaciones previas de nuestro grupo que demuestran la ausencia de corrientes iónicas de sodio activadas por voltaje en líneas celulares de CaCu (SiHa, HeLa y C33A) (Lopez-Charcas et al., 2018; Laura et al., 2019), en el presente trabajo nos propusimos estudiar los niveles de expresión relativos de dichas variantes en las células antes mencionadas, con la intención de investigar su contribución a la capacidad metastásica de las células de CaCu. Para ellos se utilizaron sondas *Custom TaqMan*[®] (Applied Biosystems) (Tabla 3) capaces de amplificar de manera específica a cada una de dichas variantes. Tal como se estipula para este tipo de experimentos de qPCR, previamente se realizaron los experimentos de rangos dinámicos para establecer la concentración de cDNA que proporcione la mejor eficiencia en las reacciones de amplificación de qPCR con tales sondas. Los porcentajes de eficiencia para las tres variantes del exón 18 de *SCN8A* estuvieron comprendidos entre 90 y 110% (**Fig. 11**), por lo que se procedió a realizar el estudio de expresión génica.

Debido a las características sumamente particulares de las variantes del exón 18 de *SCN8A*, máxime para la variante $\Delta 18$, la cual carece completamente de dicho exón, decidimos asegurarnos de que los productos de qPCR tuvieran la identidad molecular esperada, tanto en longitud del amplicón como en la secuencia nucleotídica del mismo (tal como se describe en la **Fig. 10**). El análisis de dichos productos con enzimas de restricción y secuenciación automática arrojó resultados un tanto inesperados, pero sumamente interesantes. En el caso de la variante adulta (18A) todas las clonas estudiadas mostraron el 100% de identidad con respecto a la secuencia esperada (**Fig. 12 y 13**). Curiosamente, para la variante 18N el producto de qPCR obtenido fue incompleto en todas las clonas estudiadas. En la clona 3 el producto de qPCR

secuenciado correspondía a la región previa al codón de paro -característico de esta variante-; mientras que el de la clona 6 pertenecía a la región posterior de dicho codón (**Fig. 15**). Estos resultados ayudaron a explicar lo observado en la caracterización enzimática de estos productos, donde los plásmidos de las dos clonas no mostraban el patrón de digestión cuando se trataban con las enzimas *Rsa I* y *Pst I* (**Fig. 14**). La secuenciación mostró que el inserto del plásmido de la clona 3 únicamente presentaba en su secuencia el sitio de restricción para la enzima *Rsa I*; mientras que el de la clona 6, para el de la enzima *Pst I*. Resultados similares se obtuvieron para las clonas 50 y 52 del producto de qPCR para la variante $\Delta 18$ (**Fig. 17C y D**). No obstante, otras dos clonas de esta variante, la número 34 y 36, si presentaron la secuencia completa de 83 pb (**Fig. 17A y B**). Este resultado, aunado al hecho de que la separación por electroforesis de los productos de qPCR tomados directamente de los tubos donde se llevó a cabo la amplificación de estos, demostró que el tamaño de dichos productos corresponde con los tamaños esperados (**Fig. 18**), nos permite concluir que los ensayos de *Taqman* amplifican de manera específica los productos de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A*.

La observación de que el tamaño de los productos de qPCR ligados en el vector pJET1.2 mostraron un tamaño diferente al observado por electroforesis se relaciona con reportes previos en la literatura en los que se describe la dificultad para manipular DNAs de canales Nav. En dichos reportes siempre se culpa a las bacterias que se usan para transformar y amplificar el DNA de los canales Nav. Una explicación se asocia con los sistemas de restricción que han sido descritos en las bacterias *E. Coli*, los cuales funcionan como mecanismo de defensa contra el DNA foráneo. En este sentido, se han descrito dos sistemas de restricción generales: el sistema de modificación de restricción tipo K (*hsdRMS*) y el sistema de restricción dependiente de metilación (*MDRS*), donde el primero se caracteriza por la funcionalidad de la endonucleasa *EcoK* en la degradación de cualquier DNA foráneo no metilado; mientras que el segundo, por la actividad de las endonucleasas codificadas por los genes *mrr* y *mcrABC* en la degradación de DNA metilado en los residuos de citocina y adeninas, respectivamente. Sin embargo, en el presente trabajo se utilizó la cepa Top10 de bacterias *E. coli* químicamente

competentes, donde tales sistemas de restricción se encuentran eliminados mediante ingeniería genética; no obstante, las bacterias Top10 presentan la endonucleasa A1 y enzima girasa, para las cuales se han reportado efectos sobre la estabilidad de los DNAs en transformaciones y la generación de deleciones, respectivamente (Hanahan et al., 1991). Además, varios trabajos han demostrado que las dificultades inherentes en el proceso de manipulación y transformación de los cDNAs de los canales Nav en los hospederos bacterianos, involucra variaciones en los tiempos y temperaturas de incubación, selección adecuada de las cepas competentes de *E. coli*, así como de nuevas relaciones estequiométricas de los antibióticos empleados en la producción del medio LB de las placas de agar (Bechi et al., 2012; Feldman & Lossin, 2014; Dhifallah et al., 2018). Por estas razones, en el presente trabajo se utilizaron adicionalmente las cepas JM109 y Stbl3 para intentar transformar y amplificar los productos de qPCR de las variantes 18N y Δ 18, sin embargo, no se obtuvieron resultados positivos en este sentido (resultados no mostrados).

Es probable que los cDNAs de los canales Nav sean tóxicos para las bacterias, de ahí que estas introduzcan cambios en el arreglo de dichos DNAs. Recientemente, se reportó una nueva estrategia que permite mejorar la estabilidad del cDNA en la manipulación y la amplificación del canal Nav1.6 de humano en *E. coli*. La propuesta consiste en la inserción de una pequeña secuencia de un intrón heterólogo -en este caso, los autores usaron el gen IgC μ de ratón- para interrumpir el marco de lectura abierto de la proteína en la construcción del plásmido. De esta forma, los múltiples codones de paro creados con la inserción de la secuencia del intrón, inhiben la traducción indeseada de la proteína en las bacterias *E. coli* mejorando la estabilidad del cDNA insertado en el plásmido (Poulin & Chahine, 2021). Curiosamente, esta estrategia había sido descrita desde el año 1996 para mejorar la estabilidad del vector que contenía el cDNA del canal CFTR (regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística), así como para facilitar la amplificación de los cDNAs clonado de los virus (Johansen, 1996; Boyd et al., 1999; Lacy-Hulbert et al., 2001).

7.2 Expresión de variantes del exón 18 del gen *SCN8A* en líneas celulares de CaCu: niveles diferenciales de mRNA.

La principal aportación del presente trabajo consiste en la evaluación de los niveles de expresión relativos de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A*. Nuestros experimentos de qPCR muestran que la variante adulta, cuantificada tanto con la sonda 18A como - indirectamente- con la sonda 5A; se expresa en niveles comparativos en las células SiHa (VPH-16), C33A (VPH negativo) e IMR-32 (neuroblastoma), con un valor de Ct cercano a 27, estando dentro de la categoría de expresión génica moderada. Sin embargo, las células HeLa (VPH-18) mostraron los niveles de expresión más bajos para esta variante (de hecho, para las tres variantes del exón 18) entre todas las células estudiadas, con valores de Ct cercanos a 29 (Tabla 5). Estos resultados son consistentes con un reporte preliminar de nuestro mismo grupo de investigación en el que se obtuvieron valores de Ct promedio cercanos a 24 para las células SiHa y C33A; mientras que en HeLa se detectaron los niveles más bajos de expresión con un valor Ct promedio de 30 (Lopez-Charcas et al., 2018). Para corroborar la sensibilidad de nuestro método de detección de la variante adulta 18A, decidimos utilizar las células HEK-Nav1.6, que sobre expresan de manera estable la variante adulta del canal Nav1.6 como fuente de mRNA con altos niveles de dicha variante. Los valores respectivos, como era de esperar, estuvieron en intervalo de genes de alta expresión con un valor de Ct promedio de 17 (Tabla 5). Estos resultados sugieren fuertemente que, tanto las células de CaCu como las de neuroblastoma, expresan niveles de mRNA para la variante adulta sustancialmente menores que en las células Hek-Nav1.6.

Para las variantes neonatal y delta se observó un comportamiento similar al de la 18A, donde las células SiHa, C33A e IMR-32 mostraron una abundancia moderada de los mRNAs para estas variantes con valores de Ct promedio entre 27 y 29; mientras que los valores para las células HeLa fueron de 34 y 35, respectivamente, indicando así, la baja expresión génica de estas variantes en las células HeLa (Tabla 5). Estos resultados de qPCR confirman observaciones cualitativas obtenidas mediante la PCR estándar, las cuales también sugieren que las células HeLa presentan el menor grado de expresión de estas variantes (**Fig. 7B**) (Lopez-Charcas et al., 2018).

Hasta el momento no se cuenta con evidencias científicas que permitan comprender el posible mecanismo mediante el cual se pudiera estar presentando la regulación génica de las variantes del procesamiento alternativo del exón 18 del gen *SCN8A*. Los resultados del presente trabajo son pioneros en este campo de investigación y plantean el reto de explicar por qué las células HeLa muestran los niveles de expresión más bajos de estas variantes entre todas las células estudiadas, y particularmente con las células SiHa (positivas a VPH-16) y C33A (negativas a VPH). Una posible explicación surge de un trabajo donde se estudió el papel de las proteínas Rbfox (Fox-1 y Fox-2) en la regulación del procesamiento alternativo del exón 18 del gen *SCN8A* neuronal. En este sentido, se mostró que la unión indistinta de estas proteínas en el sitio de unión localizado 28 pb en dirección río abajo del exón 18A, favorece la presencia de la variante adulta sobre la neonatal o delta del exón 18, quedando aún sin esclarecer los mecanismos moleculares de tal fenómeno (O'Brien et al; 2012). Según lo reportado en el Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>), se ha observado la presencia de la proteína Fox-2 en las células HeLa, pero de manera más abundante en las células SiHa; por lo que la proteína Fox-2 podría ser un factor que contribuya a la baja expresión de la variante adulta del exón 18 en las células HeLa. No obstante, se requiere realizar más estudios en un número más amplio de líneas celulares y biopsias de CaCu para poder concluir si éste es un fenómeno puntual para las células HeLa o un mecanismo general para el cáncer cervicouterino.

Una explicación alternativa pudiera involucrar la participación diferencial del tipo de VPH con el que están infectadas estas líneas celulares. Las células SiHa son positivas a VPH-16 mientras que las HeLa presentan DNA del VPH tipo 18. Los resultados previamente reportados por nuestro grupo de investigación indica que, si bien la sobre expresión del mRNA de canal Nav1.6 es indistinto del tipo de VPH que presentan las biopsias de CaCu, también es cierto que existe una diferencia palpable en los niveles de expresión de dicho mRNA entre las biopsias positivas a VPH16 y VPH-18. En promedio, las biopsias positivas a VPH-16 sobre expresan el mRNA del canal Nav1.6 alrededor de 28 veces, mientras que en las positivas a VPH-18 la sobre expresión es de 8 veces, respecto al tejido cervical no canceroso (Lopez-Charcas, et al., 2018). En este mismo

contexto, biopsias positivas a VPH-31 y VPH-45 sobre expresaron 14 y 6 veces, respectivamente, los niveles de mRNA del canal Nav1.6 en comparación con biopsias de tejido cervical no canceroso (Lopez-Charcas, et al., 2018). Bajo la luz de estos resultados, es posible proponer que las células y biopsias de CaCu positivas a VPH-16 presenten una mayor sobre expresión de la variante adulta en comparación con otras muestras de CaCu positivas a VPHs oncogénicos distintos al tipo 16. No obstante, si esta explicación también es válida para la pobre expresión de las variantes neonatal y delta en las células HeLa queda todavía por ser estudiado.

7.3 Expresión de variantes del exón 18 del gen *SCN8A* en líneas celulares de CaCu: contribución a la capacidad metastásica.

En la última parte del presente trabajo de tesis se analizó la expresión diferencial de las variantes del exón 18 de *SCN8A* mediante el método de $2^{-\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001) en las células de CaCu ya mencionadas. El resumen de los resultados de estos experimentos muestra contundentemente que las células HeLa expresan los niveles más bajos de las tres variantes del exón 18 en comparación con las células SiHa (positivas a VPH-16) e incluso con las células C33A, que son células cancerosas de cérvix uterino pero que son negativas al VPH (**Fig. 21**). Paralelamente, también encontramos que las células de neuroblastoma expresan niveles más altos de las variantes del exón 18 de *SCN8A* que las células HeLa (**Fig. 22**); sin embargo, para los fines del presente trabajo, no se discutirá la posible participación de dichas variantes en las propiedades metastásicas de dicho tipo de cáncer y nos concentraremos en el CaCu. Esta interrogante se podrá abordar en trabajos futuros en nuestro grupo de investigación.

Los resultados de la expresión diferencial sugieren que las células SiHa precisan de una mayor contribución de la variante $\Delta 18$ que de la neonatal para su capacidad metastásica, lo cual podría sustentarse con lo reportado para la línea celular HTB-66 de melanoma invasivo donde se observó una participación de esta variante en la invasividad de dichas células favoreciendo la formación de invadopodios (Carrithers et al., 2009). Interesantemente, las células SiHa presentan una capacidad metastásica (considerando parámetros como proliferación, migración e invasividad) menor a la

observada en las células HeLa (Sanchez-Sandoval & Gomora, 2019). Este último reporte plantea entonces la posibilidad de que la más alta expresión relativa de la variante $\Delta 18$ en las células SiHa no necesariamente sea la explicación de su capacidad metastásica, pues a pesar de expresar niveles significativamente más bajos de dicha variante, las células HeLa despliegan una capacidad metastásica más robusta. Huelga decir que las propiedades metastásicas de cualquier tipo de cáncer no son el resultado de un fenómeno unifactorial, por el contrario, se ha demostrado la participación de una gran cantidad de proteínas a dicho comportamiento cancerígeno. En línea con esta afirmación, se ha reportado que la subunidad auxiliar $\beta 4$ de los canales Nav desempeñan una función como regulador negativo de la invasividad de las células SiHa y HeLa (Sanchez-Sandoval & Gomora, 2019), por lo que las diferencias en invasividad mostradas por ambas líneas celulares podrían ser debidas a otros factores además de la expresión de la variante $\Delta 18$ del gen *SCN8A*. Resulta evidente que se precisan de experimentos funcionales *in vitro* que permitan esclarecer estas interrogantes.

8. CONCLUSIONES

- La eficiencia de las sondas *Custom TaqMan*[®] de Applied Biosystems para cuantificar los niveles de expresión de las variantes 18A, 18N y Δ 18 del exón 18 del gen *SCN8A* es de 96%, 95% y 102%, respectivamente, en el rango de diluciones seriadas estudiado.
- Los experimentos de clonación de los productos de qPCR, así como su posterior caracterización con en el empleo de enzimas de restricción y experimentos de secuenciación automática, corroboran la especificidad de las sondas *Custom TaqMan*[®] en la amplificación de las regiones interés.
- Las líneas celulares SiHa (VPH-16) y C33A (negativa VPH) de CaCu mostraron similares niveles de expresión para las variantes del exón 18 del gen *SCN8A*; mientras que las células HeLa (VPH-18) presentaron los niveles más bajos.
- Las variaciones en los niveles de expresión de las variantes del exón 18, entre líneas celulares de CaCu positivas y negativa a VPH, no mostraron diferencias entre las células SiHa y las C33A para la variante adulta; mientras que las células HeLa mostraron niveles de expresión relativos equivalentes a una tercera parte de lo cuantificado en las primeras. Esta diferencia se asentó dramáticamente para las variantes 18N y Δ 18, indicando niveles casi imperceptibles de estas en las células HeLa.
- La expresión relativa del mRNA de la variante adulta del canal Nav1.6 se ve favorecida en células de CaCu positivos a VPH-16 por sobre el tipo 18 del virus.
- La mayor expresión de la variante Δ 18 en las células SiHa con respecto a las HeLa no se correlaciona con una capacidad metastásica más robusta de las primeras como ha sido reportado.

9. PERSPECTIVAS

En consecuencia, con la finalidad de explicar los resultados obtenidos en este trabajo de maestría, mi proyecto de doctorado representa una continuidad de estos estudios, para el cual he trazado los siguientes objetivos generales:

- Cuantificar los niveles de expresión relativos de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A* en biopsias de CaCu.
- Evaluar el nivel de contribución de cada una de dichas variantes en la capacidad metastásica de células de CaCu mediante estudios *in vitro* de proliferación, migración e invasividad celular.
- Estudiar la localización subcelular de la variante $\Delta 18$ del gen *SCN8A* en células de CaCu.

10. REFERENCIAS

1. Ahern, C. A., Payandeh, J., Bosmans, F., & Chanda, B. (2016). The hitchhiker's guide to the voltage-gated sodium channel galaxy. *Journal of General Physiology*, *147*(1), 1–24. <https://doi.org/10.1085/jgp.201511492>.
2. Asher, V., Sowter, H., Shaw, R., Bali, A., & Khan, R. (2010). Eag and HERG potassium channels as novel therapeutic targets in cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, *8*(1), 113. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-8-113>.
3. Bechi, G., Scalmani, P., Schiavon, E., Rusconi, R., & Mantegazza, M. (2012). *Pure haploinsufficiency for Dravet syndrome Na V 1 . 1 (SCN1A) sodium channel truncating mutations*. *53*(1), 87–100. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03346.x>.
4. Bennett, E. S., Smith, B. A., & Harper, J. M. (2004). Voltage-gated Na⁺ channels confer invasive properties on human prostate cancer cells. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, *447*(6), 908–914. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1205-x>.
5. Besson, P., Driffort, V., Bon, É., Gradek, F., Chevalier, S., & Roger, S. (2015). How do voltage-gated sodium channels enhance migration and invasiveness in cancer cells? *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1848*(10), 2493–2501. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.04.013>.
6. Boiko, T., Rasband, M. N., Levinson, S. R., Caldwell, J. H., Mandel, G., Trimmer, J. S., & Matthews, G. (2001). Compact myelin dictates the differential targeting of two sodium channel isoforms in the same axon. *Neuron*, *30*(1), 91–104. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00265-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00265-3).
7. Bon, E., Driffort, V., Gradek, F., Martinez-Caceres, C., Anachelin, M., Pelegrin, P., Cayuela, M. L., Marionneau-Lambot, S., Oullier, T., Guibon, R., Fromont, G., Gutierrez-Pajares, J. L., Domingo, I., Piver, E., Moreau, A., Burlaud-Gaillard, J., Frank, P. G., Chevalier, S., Besson, P., & Roger, S. (2016). SCN4B acts as a metastasis-suppressor gene preventing hyperactivation of cell migration in breast cancer. *Nature Communications*, *7*. <https://doi.org/10.1038/ncomms13648>.
8. Boyd, A. C., Popp, F., Michaelis, U., Davidson, H., Davidson-Smith, H., Doherty, A., McLachlan, G., Porteous, D. J., & Seeber, S. (1999). Insertion of Natural Intron 6a-6b into a Human cDNA-derived Gene Therapy Vector for Cystic Fibrosis Improves Plasmid Stability and Permits Facile RNA/DNA Discrimination. *Journal of Gene Medicine*, *1*(5), 312–321. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1521-2254\(199909/10\)1:5<312::aid-jgm55>3.0.co;2-#](https://doi.org/10.1002/(sici)1521-2254(199909/10)1:5<312::aid-jgm55>3.0.co;2-#).
9. Bray, F., Ferlay, J., & Soerjomataram, I. (2018). *Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
10. Brisson, L., Gillet, L., Calaghan, S., Besson, P., Le Guennec, J. Y., Roger, S., & Gore, J. (2011). Na v 1.5 enhances breast cancer cell invasiveness by increasing NHE1-dependent H efflux in caveolae. *Oncogene*, *30*(17), 2070–2076. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.574>.
11. Brisson, Lucie, Driffort, V., Benoist, L., Poet, M., Counillon, L., Antelmi, E., Rubino, R., Besson, P., Labbal, F., Chevalier, S., Reshkin, S. J., Gore, J., & Roger, S. (2013). NaV1.5 Na⁺ channels allosterically regulate the NHE-1 exchanger and promote the activity of breast cancer cell invadopodia. *Journal of Cell Science*, *126*(21), 4835–4842. <https://doi.org/10.1242/jcs.123901>.
12. Burbidge, S. A., Dale, T. J., Powell, A. J., Whitaker, W. R. J., Xie, X. M., Romanos, M. A., & Clare, J. J. (2002). Molecular cloning, distribution and functional analysis of the NAV1.6. Voltage-gated sodium channel from human brain. *Molecular Brain Research*, *103*(1–2), 80–90. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(02\)00188-2](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(02)00188-2).

13. Carrithers, M. D., Chatterjee, G., Carrithers, L. M., Offoha, R., Iheagwara, U., Rahner, C., Graham, M., & Waxman, S. G. (2009). Regulation of podosome formation in macrophages by a splice variant of the sodium channel SCN8A. *Journal of Biological Chemistry*, 284(12), 8114–8126. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801892200>.
14. Catterall, William A.; Perez-Reyes, Edward; Snutch, Terrance & Striessnig, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 411–425. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.8>.
15. Catterall, W. A. (2012). Voltage-gated sodium channels at 60: Structure, function and pathophysiology. *Journal of Physiology*, 590(11), 2577–2589. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.224204>.
16. Chen, R., Zeng, X., Zhang, R., Huang, J., Kuang, X., Yang, J., Liu, J., Tawfik, O., Brantley Thrasher, J., & Li, B. (2014). Cav1.3 channel α 1D protein is overexpressed and modulates androgen receptor transactivation in prostate cancers. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 32(5), 524–536. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2013.05.011>.
17. Das, A., Pushparaj, C., Herreros, J., Nager, M., Vilella, R., Portero, M., Pamplona, R., Matias-Guiu, X., Martí, R. M., & Cantí, C. (2013). T-type calcium channel blockers inhibit autophagy and promote apoptosis of malignant melanoma cells. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 26(6), 874–885. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12155>.
18. Davis, G. C., Kong, Y., Paige, M., Li, Z., Merrick, E. C., Hansen, T., Suy, S., Wang, K., Dakshanamurthy, S., Cordova, A., McManus, O. B., Williams, B. S., Chruszcz, M., Minor, W., Patel, M. K., & Brown, M. L. (2012). Asymmetric synthesis and evaluation of a hydroxyphenylamide voltage-gated sodium channel blocker in human prostate cancer xenografts. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 20(6), 2180–2188. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.08.061>.
19. Dhifallah, S., Lancaster, E., Merrill, S., Leroudier, N., Mantegazza, M., & Cestèle, S. (2018). *Gain of Function for the Responsible for Familial Hemiplegic Migraine*. 11(July), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00232>.
20. Ding, X. W., Luo, H. S., Jin, X., Yan, J. J., & Ai, Y. W. (2007). Aberrant expression of Eag1 potassium channels in gastric cancer patients and cell lines. *Medical Oncology*, 24(3), 345–350. <https://doi.org/10.1007/s12032-007-0015-y>.
21. Ding, Y., & Djamgoz, M. B. A. (2004). Serum concentration modifies amplitude and kinetics of voltage-gated Na⁺ current in the Mat-LyLu cell line of rat prostate cancer. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(7), 1249–1260. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.10.010>.
22. Diss, J. K.J., Fraser, S. P., & Djamgoz, M. B. A. (2004). Voltage-gated Na⁺ channels: Multiplicity of expression, plasticity, functional implications and pathophysiological aspects. *European Biophysics Journal*, 33(3), 180–193. <https://doi.org/10.1007/s00249-004-0389-0>.
23. Diss, James K.J., Archer, S. N., Hirano, J., Fraser, S. P., & Djamgoz, M. B. A. (2001). Expression profiles of voltage-gated Na⁺ channel α -subunit genes in rat and human prostate cancer cell lines. *Prostate*, 48(3), 165–178. <https://doi.org/10.1002/pros.1095>.
24. Eren, O. O., Ozturk, M. A., Sonmez, O. U., & Oyan, B. (2015). Voltage-gated sodium channel blockers can augment the efficacy of chemotherapeutics by their inhibitory effect on epithelial-mesenchymal transition. *Medical Hypotheses*, 84(1), 11–13. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2014.11.006>.
25. Feldman, D. H., & Lossin, C. (2014). MethodsX The Na^v channel bench series: Plasmid. *MethodsX*, 1, 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2014.01.002>.
26. Fraser, S. P., Diss, J. K. J., Chioni, A. M., Mycielska, M. E., Pan, H., Yamaci, R. F., Pani, F., Siwy,

- Z., Krasowska, M., Grzywna, Z., Brackenbury, W. J., Theodorou, D., Koyutürk, M., Kaya, H., Battaloglu, E., De Bella, M. T., Slade, M. J., Tolhurst, R., Palmieri, C., ... Djamgoz, M. B. A. (2005). Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clinical Cancer Research*, *11*(15), 5381–5389. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0327>.
27. Grimes, J. A., & Djamgoz, M. B. A. (1998). Electrophysiological characterization of voltage-gated Na⁺ current expressed in the highly metastatic Mat-LyLu cell line of rat prostate cancer. *Journal of Cellular Physiology*, *175*(1), 50–58. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199804\)175:1<50::AID-JCP6>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199804)175:1<50::AID-JCP6>3.0.CO;2-B).
 28. Hanahan, D., Jessee, J., & Bloom, F. R. (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods in Enzymology*, *204*(C), 63–113. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)04006-A](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)04006-A).
 29. Hartung, F., Stühmer, W., & Pardo, L. A. (2011). Tumor cell-selective apoptosis induction through targeting of KV10.1 via bifunctional TRAIL antibody. *Molecular Cancer*, *10*(1), 109. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-109>.
 30. Hernandez-Plata, E., Ortiz, C. S., Marquina-Castillo, B., Medina-Martinez, I., Alfaro, A., Berumen, J., Rivera, M., & Gomora, J. C. (2012). Overexpression of Na V1.6 channels is associated with the invasion capacity of human cervical cancer. *International Journal of Cancer*, *130*(9), 2013–2023. <https://doi.org/10.1002/ijc.26210>.
 31. Hille, R. T. (2001). Ion Channels of Excitable Membranes. In *The New Public Library* (Third Edit). Sinauer Associates, Inc. <https://doi.org/10.4324/9780429449680-1>.
 32. Huaizong, Shen; Dongliang, Liu; Kun, Wu; Jianlin, Lei; Nieng, Y. (2019). Structures of human Nav1.7 channel in complex with auxiliary subunits and animal toxins. *RESEARCH*, *1308*(March), 1303–1308.
 33. Isom, L. L., Ragsdale, D. S., De Jongh, K. S., Westenbroek, R. E., Reber, B. F. X., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1995). Structure and function of the $\beta 2$ subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell*, *83*(3), 433–442. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90121-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90121-3).
 34. Jansson, K. H., Castillo, D. G., Morris, J. W., Boggs, M. E., Czymmek, K. J., Adams, E. L., Schramm, L. P., & Sikes, R. A. (2014). Identification of beta-2 as a key cell adhesion molecule in PCa cell neurotropic behavior: A novel ex vivo and biophysical approach. *PLoS ONE*, *9*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098408>.
 35. Johansen, I. (1996). Intron insertion facilitates amplification of cloned virus cDNA in *Escherichia coli* while biological activity is reestablished after transcription in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *93*, 12400–12405. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1281-1>.
 36. Kaczmarek, J. A., & Corry, B. (2014). Investigating the size and dynamics of voltage-gated sodium channel fenestrations: A molecular dynamics study. *Channels*, *8*(3), 264–277. <https://doi.org/10.4161/chan.28136>.
 37. Kaplan, M. R., Cho, M. H., Ullian, E. M., Isom, L. L., Levinson, S. R., & Barres, B. A. (2001). Differential control of clustering of the sodium channels Nav1.2 and Nav1.6 at developing CNS nodes of Ranvier. *Neuron*, *30*(1), 105–119. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00266-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00266-5).
 38. Lacy-Hulbert, A., Thomas, R., Li, X. P., Lilley, C. E., Coffin, R. S., & Roes, J. (2001). Interruption of coding sequences by heterologous introns can enhance the functional expression of recombinant genes. *Gene Therapy*, *8*(8), 649–653. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301440>.
 39. Lee, J. H., Park, J. W., Byun, J. K., Kim, H. K., Ryu, P. D., Lee, S. Y., & Kim, D. Y. (2015). Silencing of voltage-gated potassium channel KV9.3 inhibits proliferation in human colon and lung

- carcinoma cells. *Oncotarget*, 6(10), 8132–8143. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3517>.
40. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
 41. Lopez-Charcas, O., Espinosa, A. M., Alfaro, A., Herrera-Carrillo, Z., Ramirez-Cordero, B. E., Cortes-Reynosa, P., Perez Salazar, E., Berumen, J., & Gomora, J. C. (2018). The invasiveness of human cervical cancer associated to the function of NaV1.6 channels is mediated by MMP-2 activity. *Scientific Reports*, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31364-y>.
 42. Martino, A., Cabiati, M., Campan, M., Prescimone, T., Minocci, D., Caselli, C., Maria, A., Giannessi, D., & Del, S. (2011). Selection of reference genes for normalization of real-time PCR data in minipig heart failure model and evaluation of TNF- α mRNA expression. *Journal of Biotechnology*, 153(3–4), 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.04.002>.
 43. Miller, C. (2000). An overview of the potassium channel family. *Genome Biology*, 1(4), 1–5. <https://doi.org/10.1186/gb-2000-1-4-reviews0004>.
 44. Nelson, M., Millican-Slater, R., Forrest, L. C., & Brackenbury, W. J. (2014). The sodium channel β 1 subunit mediates outgrowth of neurite-like processes on breast cancer cells and promotes tumour growth and metastasis. *International Journal of Cancer*, 135(10), 2338–2351. <https://doi.org/10.1002/ijc.28890>.
 45. O'Brien, Janelle E.; Drews, Valerie L.; Jones, Julie M.; Dugas, Jason C., Barres, B. A. (2012). Rbfox Proteins Regulate Alternative Splicing Aof Neuronal Sodium Channel SCN. *Mol Cell Neuroscience*, 49(2), 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2011.10.005.RBFOX>.
 46. Ohkubo, T., & Yamazaki, J. (2012). T-type voltage-activated calcium channel Ca v3.1, but not Ca v3.2, is involved in the inhibition of proliferation and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *International Journal of Oncology*, 41(1), 267–275. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1422>.
 47. Organizacion Mundial de la Salud. (2018). Estadísticas Sanitarias Mundiales. In *Organización Mundial de la Salud* (Vol. 15, Issue 40). http://awsassets.wfnz.panda.org/downloads/earth_summit_2012_v3.pdf%0Ahttp://hdl.handle.net/10239/131%0Ahttps://www.uam.es/gruposinv/meva/publicaciones/jesus/capitulos_espanyol_jesus/2005_motivacion_para_el_aprendizaje_Perspectiva_alumnos.pdf%0Ahttps://ww.
 48. Organizacion Mundial de la Salud. (2020). Estadísticas Sanitarias Mundiales. In *Organización Mundial de la Salud* (Vol. 1, Issue 2).
 49. Park, H. W., Song, M. S., Sim, H. J., Ryu, P. D., & Lee, S. Y. (2021). The role of the voltage-gated potassium channel, Kv2.1 in prostate cancer cell migration. *BMB Reports*, 54(2), 130–135. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2021.54.2.210>.
 50. Patel, F., & Brackenbury, W. J. (2015). Dual roles of voltage-gated sodium channels in development and cancer. *International Journal of Developmental Biology*, 59(7–9), 357–366. <https://doi.org/10.1387/ijdb.150171wb>.
 51. Plummer, N. W., McBurney, M. W., & Meisler, M. H. (1997). Alternative splicing of the sodium channel SCN8A predicts a truncated two-domain protein in fetal brain and non-neuronal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272(38), 24008–24015. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.38.24008>.
 52. Poulin, H., & Chahine, M. (2021). R1617Q epilepsy mutation slows NaV1.6 sodium channel inactivation and increases the persistent current and neuronal firing. *Journal of Physiology*, 599(5), 1651–1664. <https://doi.org/10.1113/JP280838>.
 53. Qu, Y., Isom, L. L., Westenbroek, R. E., Rogers, J. C., Tanada, T. N., McCormick, K. A., Scheuer,

- T., & Catterall, W. A. (1995). Modulation of cardiac Na⁺ channel expression in *Xenopus oocytes* by β 1 subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 270(43), 25696–25701. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.43.25696>.
54. Rao, V. R., Perez-Neut, M., Kaja, S., & Gentile, S. (2015). Voltage-gated ion channels in cancer cell proliferation. *Cancers*, 7(2), 849–875. <https://doi.org/10.3390/cancers7020813>.
 55. Roger, S., Besson, P., & Le Guennec, J. Y. (2003). Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1616(2), 107–111. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2003.07.001>.
 56. Roger, S., Gillet, L., Le Guennec, J. Y., & Besson, P. (2015). Voltage-gated sodium channels and cancer: Is excitability their primary role? *Frontiers in Pharmacology*, 6(JUL), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00152>.
 57. Sanchez-Sandoval, A. L., & Gomora, J. C. (2019). Contribution of voltage-gated sodium channel β -subunits to cervical cancer cells metastatic behavior. *Cancer Cell International*, 19(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0757-6>.
 58. Sarao, R., Gupta, S. K., Auld, V. J., & Dunn, R. J. (1991). Developmentally regulated alternative RNA splicing of rat brain sodium channel mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 19(20), 5673–5679. <https://doi.org/10.1093/nar/19.20.5673>.
 59. Shen, H., Zhou, Q., Pan, X., Li, Z., Wu, J., & Yan, N. (2017). Structure of a eukaryotic voltage-gated sodium channel at near-atomic resolution. *Science*, 355(6328). <https://doi.org/10.1126/science.aal4326>.
 60. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
 61. Tumilowicz, J. J., Nichols, W. W., Cholon, J. J., & Greene, A. E. (1970). Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma. *Cancer Research*, 30(8), 2110–2118.
 62. Valerie, N. C. K., Dziegielewska, B., Hosing, A. S., Augustin, E., Gray, L. S., Brautigan, D. L., Lerner, J. M., & Dziegielewski, J. (2013). Inhibition of T-type calcium channels disrupts Akt signaling and promotes apoptosis in glioblastoma cells. *Biochemical Pharmacology*, 85(7), 888–897. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.12.017>.
 63. Wu, J., Zhong, D., Wu, X., Sha, M., Kang, L., & Ding, Z. (2013). Voltage-gated potassium channel Kv1.3 is highly expressed in human osteosarcoma and promotes osteosarcoma growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 19245–19256. <https://doi.org/10.3390/ijms140919245>.
 64. Xia, J., Huang, N., Huang, H., Sun, L., Dong, S., Su, J., Zhang, J., Wang, L., Lin, L., Shi, M., Bin, J., Liao, Y., Li, N., & Liao, W. (2016). Voltage-gated sodium channel Nav1.7 promotes gastric cancer progression through MACC1-mediated upregulation of NHE1. *International Journal of Cancer*, 139(11), 2553–2569. <https://doi.org/10.1002/ijc.30381>.
 65. Yu, F. H., & Catterall, W. A. (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biology*, 4(3). <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-3-207>.
 66. Zakon, H. H. (2012). Adaptive evolution of voltage-gated sodium channels: The first 800 million years. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(SUPPL.1), 10619–10625. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201884109>.