



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Doctorado en Ciencias Bioquímicas
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**“CANALES DE SODIO ACTIVADOS POR VOLTAJE:
POTENCIAL COMO MARCADORES MOLECULARES
Y BLANCOS TERAPÉUTICOS DEL CÁNCER CERVICOUTERINO”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. EVERARDO HERNÁNDEZ PLATA

TUTOR PRINCIPAL:

DR. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. NORMA A. BOBADILLA SANDOVAL
DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, D. F., SEPTIEMBRE, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“CANALES DE SODIO ACTIVADOS POR VOLTAJE: POTENCIAL COMO MARCADORES MOLECULARES Y BLANCOS TERAPÉUTICOS DEL CÁNCER CERVICOUTERINO”

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Gómora Martínez, en el Laboratorio BL-203 del Departamento de Neuropatología Molecular, del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Además, en el Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis participaron:

Dra. Norma Alicia Bobadilla Sandoval, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Dra. Marcela Lizano Soberón, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Se reconoce el generoso apoyo brindado por el Dr. Edward Perez-Reyes, de la Universidad de Virginia, Estados Unidos durante la realización de una estancia académica en su laboratorio para el desarrollo de shRNAs, empleados en esta tesis.

Se reconoce el apoyo del Dr. Félix Recillas Targa, en la generación de partículas lentivirales utilizadas en algunos experimentos de la presente tesis.

Se reconoce el apoyo, disponibilidad, asesoría, tiempo y dedicación del Q.F.B. Edgar Fernán González Buendía, en la generación de partículas lentivirales.

Se reconoce el apoyo de la Biól. Georgina Guerrero Avendaño, en la generación de partículas lentivirales.

Se reconoce el apoyo del Dr. Lourival Possani, quien gentilmente donó la toxina Cn2 empleada en algunos experimentos de esta tesis.

Se reconoce el apoyo técnico y discusiones académicas de la Dra. Clara Estela Díaz Velásquez, para el desarrollo de algunos experimentos incluidos en esta tesis.

Se reconoce el apoyo técnico de la Dra. Zazil Herrera Castillo, en el desarrollo de algunos experimentos incluidos en la presente tesis.

Se reconoce el apoyo de la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular, por su atención profesional y respaldo en la instalación de software empleado en múltiples etapas del desarrollo de la presente tesis.

Se reconoce el apoyo de la Biblioteca del Instituto de Fisiología Celular, en la reunión de referencias bibliográficas empleadas durante el desarrollo de mi proyecto.

Durante los estudios de doctorado gocé de una beca otorgada por el ICyTDF. Asimismo, al final de mis estudios recibí otra beca del CONACyT por un periodo de seis meses, derivada del Proyecto No. 167790.

El jurado de examen de doctorado estuvo conformado por:

Presidente	Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal	Dra. María Sitges Berrondo	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Secretario	Dra. Marcia Hiriart Urdanivia	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dra. Leticia Rocha Zavaleta	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Suplente	Dr. Javier Camacho Arroyo	Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del IPN

ÍNDICE

RESUMEN	1
CÁNCER CERVICOUTERINO	5
CÁNCER Y CANALES IÓNICOS	8
CARACTERÍSTICAS DE LOS CANALES Na_v	10
EXPRESIÓN FUNCIONAL DE CANALES Na_v EN CÁNCER	14
CANALES Na_v EN CACU	17
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS	18
BIOPSIAS	19
CULTIVOS CELULARES DE BIOPSIAS DE CACU	19
EXTRACCIÓN DE RNA	20
REACCIONES DE PCR EN TIEMPO REAL (qPCR)	21
EXPERIMENTOS DE PATCH CLAMP	27
TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HEK-293 Y HELA CON CANALES Na_v	29
CONSTRUCCIÓN DE SHRNAs CONTRA $Na_v1.6$	30
GENERACIÓN DE LENTIVIRUS CON SHRNA CONTRA $Na_v1.6$	33
TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS DE CACU CON LENTIVIRUS 16H Y 16S	34
RESULTADOS	36
NIVELES DE MRNA DE SUBUNIDADES DE CANALES Na_v EN MUESTRAS DE CÉRVIX UTERINO:	36
SOBRE EXPRESIÓN ESPECÍFICA DE $Na_v1.6$ EN CACU.	36
LAS CÉLULAS DE CACU NO EXPRESAN LOS CANALES RESISTENTES A LA TTX $Na_v1.5$	39
EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE SUBUNIDADES $Na_v\beta$ EN CULTIVOS PRIMARIOS Y BIOPSIAS DE CACU	43
LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA DE LAS SUBUNIDADES $Na_v1.6$ Y $Na_v1.7$ EN CACU	45
PARTICIPACIÓN DE LOS CANALES Na_v EN EL COMPORTAMIENTO METASTÁSICO DE LAS CÉLULAS DE CACU	48
ABATIMIENTO DE LA EXPRESIÓN DEL CANAL $Na_v1.6$ MEDIANTE SHRNAs	50
EXPRESIÓN DE CANALES Na_v EXÓGENOS EN LÍNEAS CELULARES DE CACU	54
DISCUSIÓN	61

PARTICIPACIÓN DE LOS CANALES Na_v EN EL CACU	61
USO DE RNA DE INTERFERENCIA PARA ESTUDIAR LA PARTICIPACIÓN DE CANALES Na_v EN EL CACU	67
CÉLULAS HELA COMO SISTEMA DE EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE CANALES Na_v	70
CONCLUSIONES	73
BIBLIOGRAFÍA	74
APÉNDICES	80
AGRADECIMIENTOS	81

RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) constituye la segunda causa de muerte por neoplasias a nivel mundial. En más del 99% de los casos, su desarrollo está directamente relacionado con la infección por uno o varios de los virus del papiloma humano (HPV) oncogénicos, de los cuales los tipos 16 y 18 son los más frecuentes. Algunas de las alteraciones observadas en las células cancerosas que contribuyen a la progresión tumoral del fenotipo maligno incluyen cambios en los patrones de expresión de proteínas de membrana como los canales iónicos. Mediante experimentos electrofisiológicos y de biología molecular, nuestro laboratorio reportó por primera vez la presencia de corrientes de sodio activadas por voltaje sensibles a la TTX en células derivadas de cultivos primarios de CaCu; lo que se correlacionó con la detección de la expresión del mRNA de distintas subunidades α que codifican para canales de sodio activados por voltaje (canales Na_v).

En la presente tesis se realizó un estudio de expresión génica de las subunidades α de canales Na_v mediante PCR en Tiempo Real. La subunidad $\text{Na}_v1.6$ presentó una sobre expresión del mRNA en el CaCu con respecto al cérvix no canceroso (CNC). Experimentos de inmunohistoquímica demostraron la presencia de la proteína del canal $\text{Na}_v1.6$ en la membrana plasmática y compartimientos intracelulares en cortes de biopsias de CaCu, mientras que en secciones de CNC la señal del canal $\text{Na}_v1.6$ se limitó exclusivamente a la membrana plasmática.

La contribución de la subunidad $\text{Na}_v1.6$ a la corriente total de sodio expresada por células de CaCu se comprobó mediante registros electrofisiológicos con la técnica de *patch clamp* y con la utilización de la toxina Cn2, específica para este canal Na_v . La misma toxina fue empleada en ensayos de invasividad, mediante los cuales se comprobó que la actividad de $\text{Na}_v1.6$ está relacionada con el potencial invasivo de las células de CaCu, por lo que hemos propuesto a la subunidad $\text{Na}_v1.6$ como un marcador molecular del CaCu y posible blanco para tratamientos terapéuticos mediante una solicitud de patente (MX/a/2011/002380).

Con el propósito de continuar el estudio de la participación del canal $\text{Na}_v1.6$ en la biología del CaCu, se generaron construcciones de plásmidos que codifican para shRNAs dirigidos contra la subunidad $\text{Na}_v1.6$, en un sistema inducible con doxiciclina. La construcción más eficiente, disminuyó los niveles de mRNA de $\text{Na}_v1.6$ en un 60%, por lo que fue seleccionada para generar lentivirus. Con ellos, se infectaron células derivadas del cultivo primario CaCu-354; como resultado, se disminuyó ~35% en la corriente total de sodio, lo que es congruente con el uso de la toxina Cn2 al bloquear la actividad de dicho canal.

Por otro lado, se investigó la expresión heteróloga de canales Na_v en células HeLa, las cuales no expresan corrientes endógenas de este tipo. Los resultados mostraron que las células HeLa transfectadas con DNA codificante para las subunidades $\text{Na}_v1.5$, $\text{Na}_v1.6$ y $\text{Na}_v1.7$ son capaces de expresar corrientes de sodio activadas por voltaje; por lo tanto, las células HeLa pueden ser empleadas como un modelo alternativo a los cultivos primarios de CaCu para profundizar en el estudio del papel de los canales Na_v en la biología del cáncer.

ABSTRACT

Cervical cancer (CaC) is the second most frequent cause of cancer-related death worldwide. In most cases (~ 99%), its development is related to the infection by one or more of the oncogenic human papillomaviruses (HPV), being types 16 and 18 the most frequently found. Some of the modifications observed in cancer cells that contribute to the tumor progression of malignant phenotype include changes in expression patterns of membrane proteins such as ion channels. Using electrophysiological and molecular biology techniques, our laboratory reported for the first time the presence of TTX-sensitive voltage gated sodium currents in primary culture cells derived from cervical carcinomas, which was correlated with the detection of mRNA for several α subunits encoding for voltage-gated sodium (Na_v) channels.

In this thesis a Real Time PCR gene expression of Na_v subunits study was performed. The $\text{Na}_v1.6$ subunit was found consistently over-expressed in CaC samples when compared with non-cancerous cervical (NCC) samples. Immunohistochemistry experiments showed the presence of $\text{Na}_v1.6$ channel protein in CaC biopsies sections at the plasma membrane and intracellular compartments, while the signal protein was confined to the plasma membrane in NCC samples.

The contribution of $\text{Na}_v1.6$ channels to the total sodium current expressed by CaC cells was explored by patch clamp electrophysiological recordings using the Cn2 toxin as a specific blocker. This toxin was also used in invasiveness assays, where it was found that $\text{Na}_v1.6$ activity is related to the invasive potential of CaC cells, therefore we have proposed the $\text{Na}_v1.6$ subunit as a molecular marker of CaC and a potential target for new therapeutic treatments (patent application: MX/a/2011/002380).

To further study the $\text{Na}_v1.6$ channel participation in CaC biology, plasmid constructs encoding shRNAs directed against the $\text{Na}_v1.6$ subunit in a doxycycline-inducible system were generated. The most efficient construction decreased levels of $\text{Na}_v1.6$ mRNA by 60%, so it was chosen to generate lentivirus. They were used to infect CaC primary cultured cells, where total sodium

current was reduced by 35%. This observation was in agreement with the results using the Cn2 toxin to block the channel activity.

Furthermore, we investigated the heterologous expression of Na_v channels in HeLa cells, which do not express endogenous voltage-gated sodium currents. The results showed that HeLa cells transfected with DNA encoding for the $\text{Na}_v1.5$, $\text{Na}_v1.6$ and $\text{Na}_v1.7$ subunits are able to express sodium currents activated by voltage. Therefore, HeLa cells could be used as an alternative model for CaC primary cultures in studies to further investigate the role of Na_v channels in CaC biology.

INTRODUCCIÓN

Cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino (CaCu) es un problema de salud de importancia primordial. A nivel mundial, es la segunda causa de muerte por neoplasias malignas en mujeres (Mahdavi & Monk, 2005). En México, se calcula que cada año 10,186 mujeres son diagnosticadas con CaCu y que cada dos horas muere una mujer a consecuencia de este cáncer (OMS/ICO; www.inegi.org.mx). No obstante, el CaCu es un cáncer 100% curable si se diagnostica a tiempo. La citología cervicovaginal, mejor conocida como prueba de Papanicolaou, la colposcopia, la histopatología y las pruebas moleculares para detectar el ácido desoxirribonucleico (DNA) del virus de papiloma humano (HPV), agente asociado a prácticamente la totalidad de los casos de CaCu, son los métodos más empleados en el diagnóstico de esta patología.

El contagio con HPV es responsable del mayor número de infecciones de transmisión sexual en las mujeres; se calcula una prevalencia global del 10.41%, con considerables variaciones dependiendo de la población analizada, siendo los países subdesarrollados los más afectados (Burchell *et al.*, 2006). Los virus del papiloma no son clasificados por serotipo, sino por genotipo, y hasta el momento se han identificado aproximadamente 130 tipos de HPV mediante la secuenciación del gen que codifica para la proteína mayor de la cápside (L1) (de Villiers *et al.*, 2004). El 99% de los casos de CaCu están asociados a la infección por algún tipo de HPV oncogénico o de alto riesgo, siendo los tipos 16 y 18 los más comúnmente encontrados en casos de cáncer (**Figura 1**) (Roden & Wu, 2006). Un análisis de la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) reporta que 105 millones de mujeres alrededor del mundo presentarán una infección con HPV 16 o 18 al menos una vez en su vida (Burchell *et al.*, 2006); sin embargo, en el ~70% de los casos el sistema inmune es capaz de eliminar las infecciones por HPV dentro de un lapso de tiempo promedio de 6-18 meses, y solo <10% de la población infectada presenta lesiones que persisten por años y progresan para generar lesiones cancerosas (Schiffman *et al.*, 2007) (**Figura 2**). Lo anterior demuestra que la infección por HPV es necesaria pero no suficiente para la aparición del CaCu, y que existen otros factores que

promueven la progresión de este cáncer (Roden & Wu, 2006). Entre los factores exógenos que contribuyen al desarrollo de la patología se encuentran la multiplicidad de parejas sexuales, tratamientos hormonales, antecedentes reproductivos, y tabaquismo (Rajkumar *et al.*, 2006).

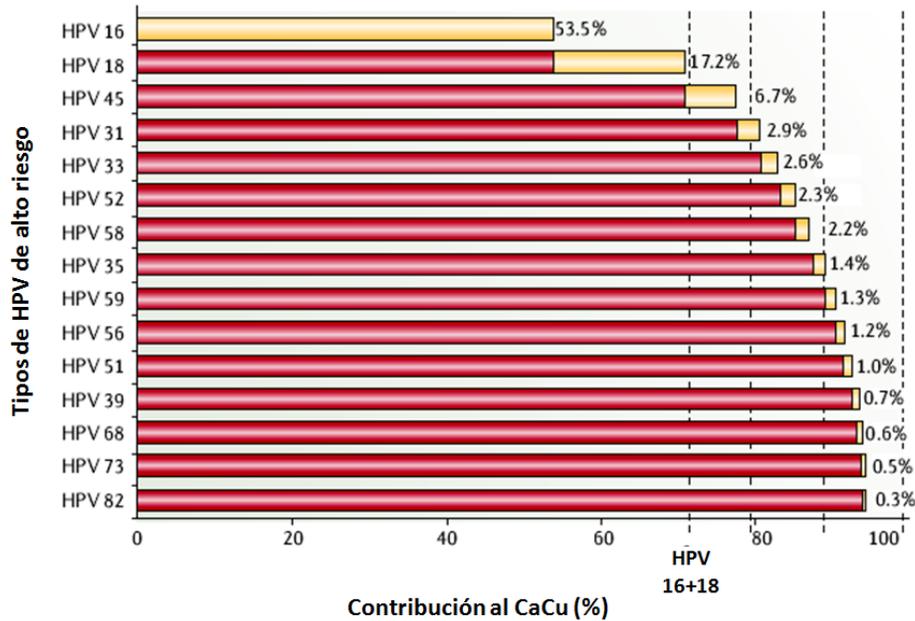


Figura 1. Proporción de casos de CaCu generados por HPV de alto riesgo. Se muestra el grupo de HPV tipificados como de alto riesgo, dada la alta frecuencia de su presencia en muestras cancerosas de cérvix uterino. Las barras amarillas representan los porcentajes que cada genotipo viral aporta a la totalidad de casos de CaCu y las barras rojas muestran los porcentajes acumulativos de casos generados por los HPV oncogénicos. Los tipos virales HPV16 y HPV18 son responsables de alrededor del 70% del total de los casos de CaCu. Modificada de (Roden & Wu, 2006).

Los virus del papiloma han coevolucionado con sus hospederos animales y el ciclo de replicación de cada genotipo de HPV se encuentra estrechamente relacionado con la diferenciación de su blanco epitelial específico (de Villiers *et al.*, 2004). La infección y proliferación de los tipos virales 16 y 18 son completamente dependientes de la diferenciación de los queratinocitos (Stanley *et al.*, 2007) y son los más frecuentemente encontrados en las mucosas anogenitales y orofaríngeas (Zandberg *et al.*, 2013). Estos virus infectan la membrana basal epitelial, en donde pueden permanecer quiescentes por años, de forma episomal o insertados en el genoma celular, hecho que es común prácticamente en la totalidad de los casos de infección con HPV18 que terminan en la generación de cáncer invasivo (Woodman *et al.*, 2007); posteriormente la

expresión de la mayoría de las proteínas virales, así como el ensamblaje viral ocurre en las capas epiteliales más externas (Doorbar, 2006).

Existen cuatro etapas en el desarrollo del CaCu: 1) infección del epitelio metaplásico en la zona de transformación cervical por transmisión del HPV; 2) persistencia viral; 3) progresión del epitelio infectado persistentemente hacia un estado precanceroso; y 4) invasión a través de la membrana basal del epitelio. Estas etapas están caracterizadas por distintos grados de alteración del epitelio cervical, que pueden ser clasificadas por pruebas histopatológicas en neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) de diferentes niveles, siguiendo una correspondencia respectiva con el desarrollo canceroso de NIC1, NIC2, NIC3 y cáncer invasivo (Woodman *et al.*, 2007; Schiffman *et al.*, 2007). No obstante, se calcula que solamente un tercio de las mujeres infectadas con algún tipo de HPV muestra alteraciones que son apreciables en muestras citopatológicas (Schiffman *et al.*, 2007).

Entre los avances de los últimos años sobre la etiopatogenia de esta enfermedad se encuentran dos vacunas profilácticas comercialmente disponibles con las que se busca inmunizar a la población contra los tipos virales más comunes: Cervarix, dirigida contra los tipos virales 16 y 18; y Gardasil, que además de los dos tipos virales anteriores busca brindar protección contra los tipos 6 y 11, responsables del 90% de los casos de verrugas genitales (Schiffman *et al.*, 2007). Su reciente aplicación (habrá que esperar una generación completa para observar los resultados), aunado a sus limitaciones logísticas (se requiere de tres dosis), y de espectro (otros HPVs oncogénicos podrían ocupar el nicho dejado por los tipos 16 y 18), etc., sugieren que la vacuna contra el CaCu dista mucho de ser la solución para este carcinoma, al menos en el corto y mediano plazo. Además, un estudio reciente reportó que, de acuerdo a un modelo matemático, se prevé un aumento en la incidencia de casos de CaCu si los esquemas de vacunación se usan como solución definitiva y se dejan de practicar las pruebas de Papanicolaou como método diagnóstico (Bauch *et al.*, 2010). Por lo tanto, la búsqueda de marcadores moleculares para un acertado diagnóstico, así como para identificar blancos terapéuticos y

brindar un tratamiento adecuado, persiste como una necesidad imperante en el campo de estudio.

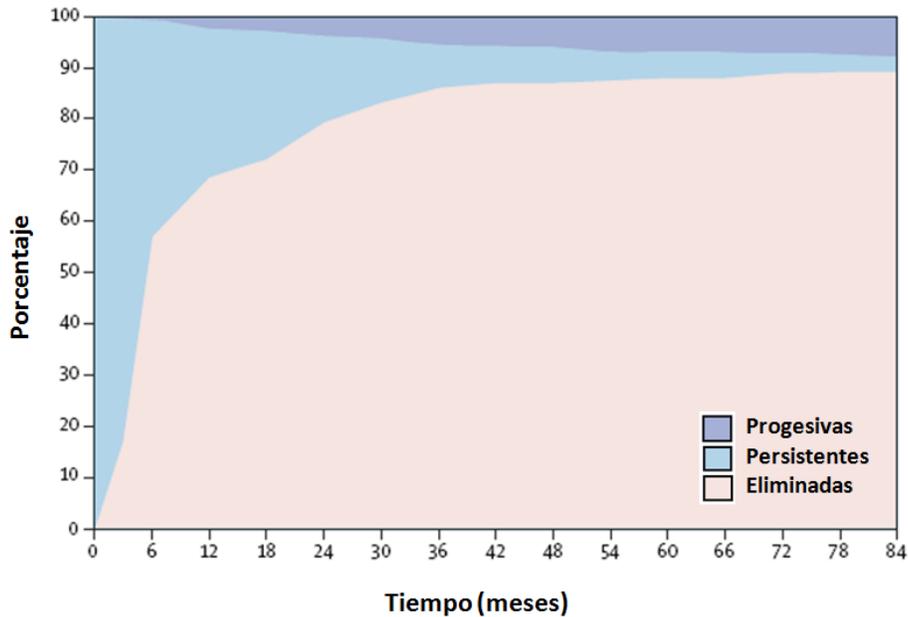


Figura 2. Eliminación, persistencia y progresión de infecciones por HPV oncogénicos. Las infecciones por HPV oncogénicos (HPV 16 y 18, principalmente) tienden a ser eliminadas por el sistema inmune dentro de los 18 meses después de su detección; sin embargo, aproximadamente un 30% de ellas persiste por años y eventualmente pueden dar origen a lesiones cancerosas. Las cifras exactas pueden variar dependiendo de la población, el estatus citológico y la edad; este diagrama es representativo de la tendencia general y corresponde a 777 casos de infección detectados en la población de Costa Rica. Modificada de (Schiffman *et al.*, 2007).

Cáncer y canales iónicos

Es bien sabido que durante el desarrollo del cáncer suceden cambios en la fisiología de las células debidos a la división celular descontrolada; aunado a ello la desregulación de procesos fisiológicos como la adhesión, movilidad, secreción, metabolismo y expresión génica, conllevan a la progresión cancerosa. En todos estos procesos celulares se ha reportado la participación de distintos canales iónicos, los cuales son proteínas membranales especializadas en la movilización de distintos iones inorgánicos, cuya expresión alterada contribuye a la sobrevivencia de las células cancerosas, su crecimiento y progresión hacia la fase de metástasis, que es en gran medida la responsable de la muerte por esta enfermedad (Schwab, 2001; Fraser

& Pardo, 2008; Prevarskaya *et al.*, 2010; Cuddapah & Sontheimer, 2011). Los canales iónicos son proteínas involucradas en vías de señalización, que se expresan prácticamente en todos los tejidos donde tienen una participación determinante en funciones celulares como transporte de iones, control de volumen, actividad enzimática, secreción, expresión génica, acople excitación-contracción, comunicación intercelular, etc. (Hille, 2001).

Recientemente, se han descubierto nuevas funciones para los canales iónicos, funciones “no canónicas” que se han asociado a aspectos relacionados con el cáncer, como la proliferación, migración y metástasis (Kaczmarek, 2006; Fraser & Pardo, 2008). En consecuencia, defectos en el funcionamiento de los canales iónicos, son frecuentemente la causa de muchas enfermedades (Jurkat-Rott & Lehmann-Horn, 2001; Diss *et al.*, 2004; Viswanathan & Balsler, 2004). En particular, la superfamilia de canales iónicos dependientes de voltaje (es decir, aquellos que se activan por cambios en el potencial de membrana, V_m) que comprende los canales de potasio (K^+), de sodio (Na^+), de calcio (Ca^{2+}) y de cloruro (Cl^-) se han relacionado con distintos aspectos de la biología del cáncer (**Figura 3**) (Fiske *et al.*, 2006; Fraser & Pardo, 2008). En el caso concreto del CaCu se ha descrito que la inhibición de los canales de potasio disminuye la tasa de proliferación de varias líneas celulares (Suzuki & Takimoto, 2004), además de que este tipo de canales son modulados durante el ciclo celular (Pardo *et al.*, 1998; Crociani *et al.*, 2003), y más recientemente, se ha propuesto a los canales de potasio tipo éter *á-go-go* (EAG) como marcador para la detección y terapia del CaCu (Farias *et al.*, 2004; Diaz *et al.*, 2009). En este contexto se ubican nuestros resultados ya publicados acerca de la expresión funcional de canales de sodio en CaCu (Diaz *et al.*, 2007), así como la sobre expresión específica del canal $Na_v1.6$ en biopsias y cultivos primarios de CaCu asociado a la infección de VPH-16 (Hernández Plata, 2008). Para una mejor comprensión del tema, a continuación se revisarán algunas características de los canales Na_v y posteriormente se resumirán las evidencias de la participación de estos canales en diferentes tipos de cáncer; así como las observaciones de nuestro propio grupo de investigación sobre su expresión funcional en células de CaCu.

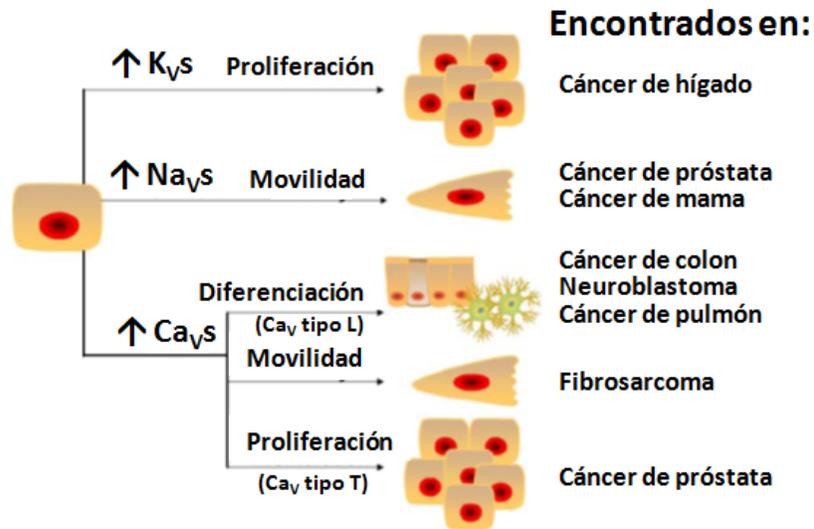


Figura 3. Canales iónicos activados por voltaje y cáncer. El aumento en los niveles de expresión de los canales iónicos puede modificar una amplia gama de procesos celulares, los cuales son fundamentales para la supervivencia de las células tumorales y la progresión hacia el fenotipo maligno. K_v s, Na_v s, y Ca_v s: canales de potasio, de sodio y de calcio activados por voltaje, respectivamente (Fiske *et al.*, 2006).

Características de los canales Na_v

Los canales Na_v son complejos multiprotéicos transmembranales constituidos por una subunidad principal α (~260 kDa), la cual forma el poro conductor por el cual fluyen los iones sodio en respuesta a despolarizaciones del potencial de membrana; y una o dos subunidades auxiliares β (~40 kDa), cuya función clásica ha sido asociada a la modulación del tráfico y las propiedades biofísicas de la subunidad principal, tales como la dependencia al voltaje, la activación y la inactivación (Para una revisión véase Catterall, 2012). Estructuralmente, la subunidad α es una proteína de aproximadamente 2000 aminoácidos que se distribuyen en cuatro dominios homólogos (I a IV), cada uno conformado por seis segmentos transmembranales (S1 a S6) unidos por asas intra y extra celulares (**Figura 4**).

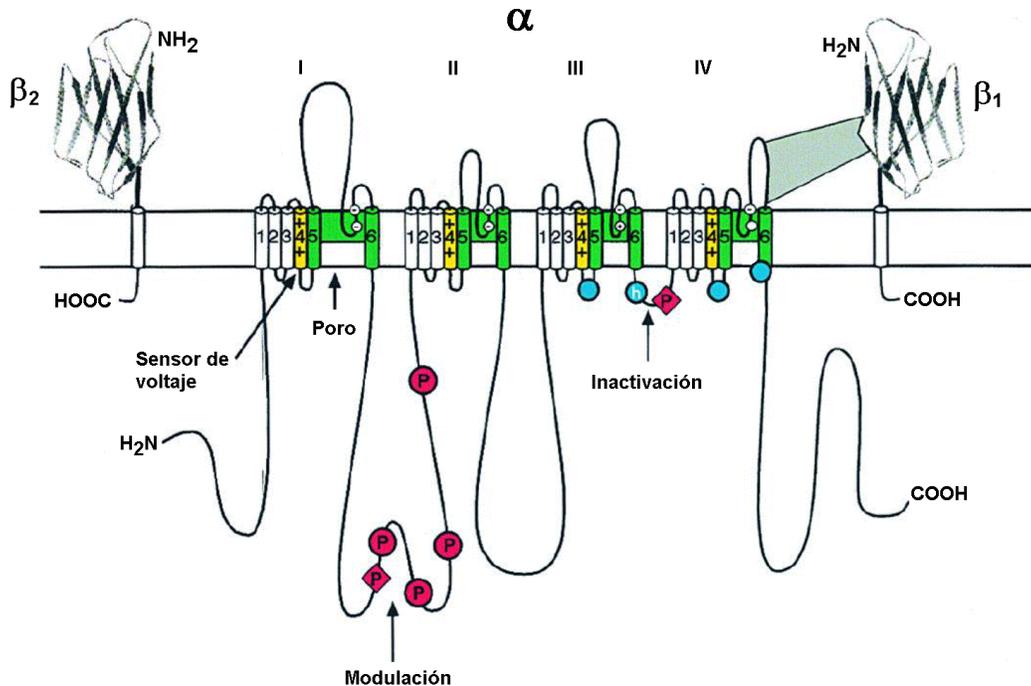


Figura 4. Representación esquemática de los canales de sodio activados por voltaje. Se muestran los cuatro dominios (I al IV) que forman la subunidad principal α de los canales Na_v , cada uno de ellos con seis segmentos transmembranales (1 - 6). Los segmentos S5 y S6 de cada dominio forman el poro del canal, mientras que los segmentos S4 conforman el sensor de voltaje. El asa que une los dominios I y II contiene varios sitios de fosforilación (P), y el asa III-IV es la responsable de la inactivación del canal. H_2N y COOH indican los extremos amino y carboxilo terminal, respectivamente. También se esquematizan dos subunidades auxiliares β a los costados de la subunidad α (Modificada de Catterall, 2000).

Hasta el momento se han clonado y caracterizado funcionalmente nueve subunidades α ($\text{Na}_v1.1$ a $\text{Na}_v1.9$), cada una codificada por un gen distinto (*SCN1A-SCN5A*, *SCN8A-SCN11A*), y que pueden ser clasificadas por el porcentaje de identidad en su secuencia de aminoácidos (**Figura 5**) y por su sensibilidad a la tetrodotoxina (TTX), la cual impide el flujo de iones a través del canal bloqueando el poro de conducción desde la parte extracelular. Así, las subunidades $\text{Na}_v1.1$ - $\text{Na}_v1.4$, $\text{Na}_v1.6$ y $\text{Na}_v1.7$ son denominadas sensibles a la TTX (TTX-S), ya que la IC_{50} de la toxina requerida para bloquear su actividad se encuentra en el rango nanomolar; a diferencia de las subunidades $\text{Na}_v1.5$, $\text{Na}_v1.8$ y $\text{Na}_v1.9$, las cuales requieren concentraciones en el orden micromolar de la toxina para poder bloquear las corrientes de sodio a través de ellos (Yu & Catterall, 2003).

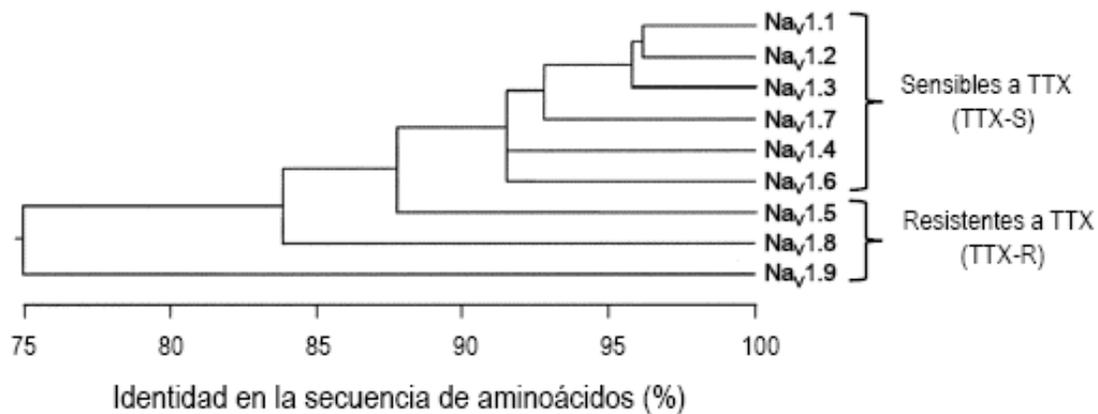


Figura 5. Árbol genealógico de los canales de sodio activados por voltaje. La comparación entre las subunidades α fue realizada con Megalign del programa DNASTar, utilizando el método CLUSTAL considerando únicamente la secuencia de aminoácidos de las regiones que atraviesan la membrana y las asas citoplasmáticas que unen los dominios III y IV (Modificada de Catterall *et al.*, 2003).

Asimismo, a la fecha se conocen cuatro genes que codifican para subunidades auxiliares β de canales de sodio SCN β 1-SCN β 4, que dan lugar a las subunidades Na β 1 a Na β 4 de un peso molecular aproximado de 40 kDa (Patino & Isom, 2010). Adicionalmente, se ha descrito la existencia de la subunidad Na β 1a, que es una isoforma de Na β 1, producida por el procesamiento alternativo del mRNA del gen SCN β 1 (Qin *et al.*, 2003). Las subunidades β tienen un solo segmento transmembranal y un extremo amino extracelular prominente con el cual pueden interactuar con la región extracelular de la subunidad α (**Figura 4**), y modificar algunas de sus propiedades funcionales tales como la dependencia al voltaje, la cinética de activación e inactivación y el tráfico hacia la membrana, lo que repercute directamente en la densidad de corriente de sodio transportada al interior de la célula. En los últimos años se han descrito nuevas funciones para las subunidades β de los canales de sodio que las ubican en interacciones con otras proteínas intra y extracelulares para establecer complejos de adhesión con células adyacentes y con la matriz extracelular (**Figura 6**) (Brackenbury *et al.*, 2008; Brackenbury & Isom, 2008; Brackenbury *et al.*, 2010).

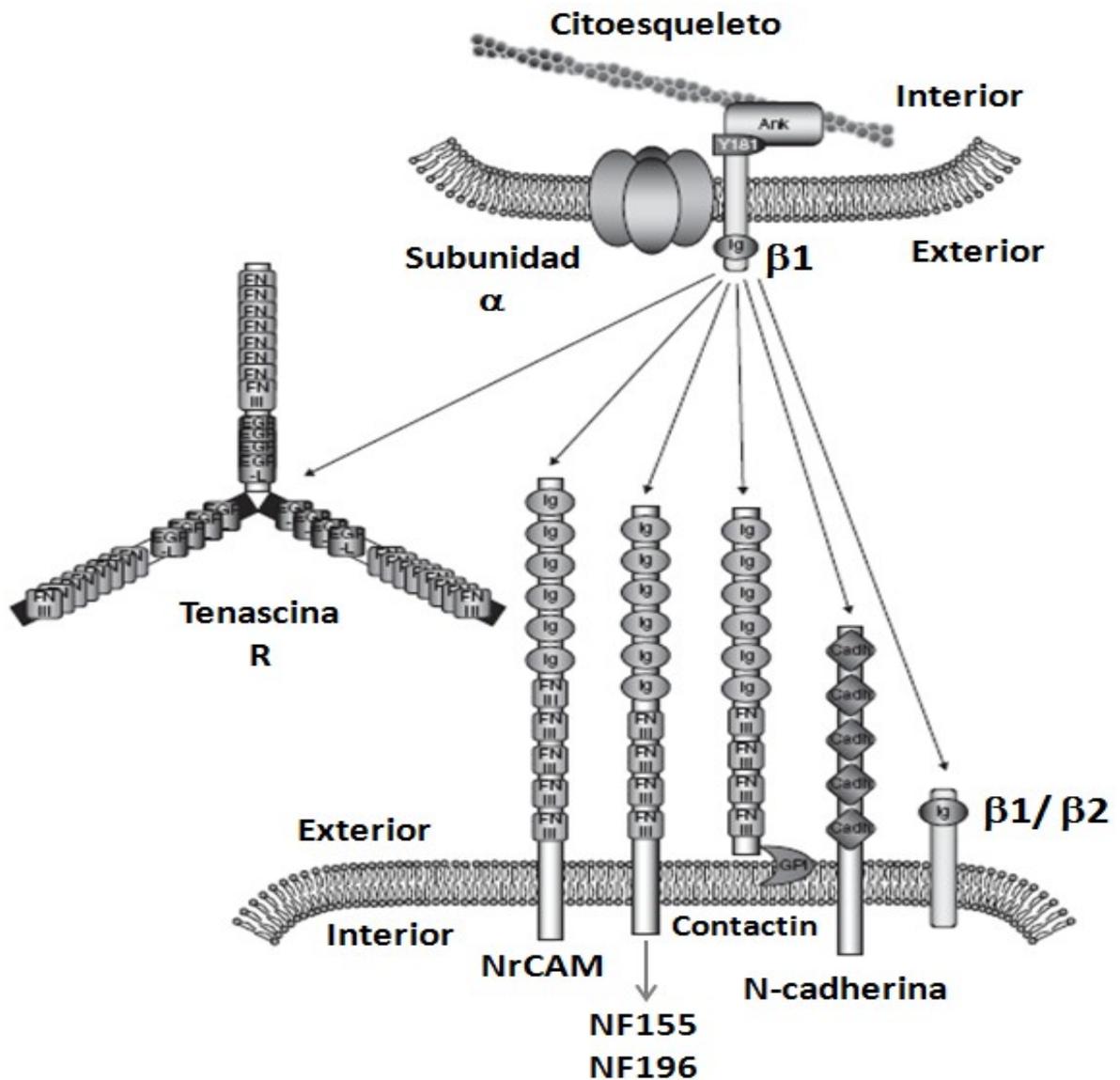


Figura 6. Proteínas de adhesión celular que interactúan con la subunidad $\beta 1$ de los canales Na_v . Interacciones heterofílicas con tenascina-R, moléculas de adhesión celular neuronal (NrCAM), neurofascinas (NF155 y NF186), contactina, N-cadherina y subunidades α ; u homofílicas con subunidades β de los canales Na_v . Las interacciones con moléculas de adhesión pueden ser *cis* o *trans*. El dominio intracelular de $\beta 1$ recluta a las proteínas anquirina G o anquirina B (Ank) en respuesta a adhesión homofílica, mediante una interacción que es dependiente de la fosforilación de la tirosina 181 de la subunidad β . Cadh: dominio cadherina; FN III: dominio del tipo fibronectina-III; EGF-L: dominio del tipo factor de crecimiento epidérmico; GPI: ancla de glicofosfatidilinositol; Ig: dominio de inmunoglobulina (Modificada de Brackenbury & Isom, 2008).

Los canales Na_v se expresan generalmente en células excitables como neuronas, células secretoras y musculares. La función más conocida de los canales Na_v es su participación en la generación y propagación de impulsos eléctricos conocidos como potenciales de acción mediante los cuales se trasmite la información entre células (Catterall, 2012). Recientemente, también se ha reportado su expresión funcional en distintos tipos de cáncer, en donde su actividad está asociada a la potenciación de la capacidad invasiva de las células cancerosas (Brackenbury, 2012), antecedente de fundamental importancia para el presente trabajo de tesis, por lo que se describe a continuación con mayor detalle.

Expresión funcional de canales Na_v en cáncer

En 1995 se reportó el primer análisis de canales de sodio activados por voltaje en células cancerosas, correspondientes a dos líneas celulares de cáncer de próstata de rata: Mat-Ly-Lu, altamente metastásica, y AT-2, pobremente metastásica. En la línea Mat-Ly-Lu se detectó una corriente entrante generada por el transporte de Na^+ a través de canales Na_v sensibles a la TTX (la corriente fue inhibida en su totalidad con una concentración de 600 nM de la toxina); mientras que en la línea, AT-2, no se encontró ninguna corriente entrante. Al evaluar la importancia de esta corriente sobre la capacidad metastásica, se observó que su inhibición se acompaña de una disminución del 50% en la capacidad de invasión de las células altamente metastásicas Mat-Ly-Lu (Grimes *et al.*, 1995). Más tarde, se reportó un fenómeno similar al estudiar dos líneas celulares de cáncer de próstata de humano: PC-3 (metastásica) y LNCaP (no invasiva) (Smith *et al.*, 1998b). Posteriormente, el mismo grupo de investigación analizó la línea DU-145 de cáncer de próstata humano, con capacidad mínima de invasión y raramente metastásica; encontrando que los canales de sodio no se expresan en dichas células (Laniado *et al.*, 1997). Este conjunto de evidencias sugería que la expresión funcional de canales Na_v era importante para que se lleve a cabo la metástasis.

Con la incorporación de estrategias experimentales de biología molecular, en un estudio realizado más tarde, se determinó que es el canal $\text{Na}_v1.7$ que presenta los mayores niveles de expresión en células de cáncer de próstata (Diss *et al.*, 2001). Por ello, la expresión de este canal

se ha propuesto como un novedoso marcador de cáncer de próstata y un nuevo blanco terapéutico (Diss *et al.*, 2005). Interesantemente, el canal específico que se expresa en las células cancerosas parece depender del tejido en el que se origina el tumor primario, dado que mediante estudios posteriores se ha observado que no siempre la subunidad Na_v1.7 es la que presenta una mayor expresión en distintos tipos de cáncer.

En 2003 se describió la expresión de una corriente de sodio activada por voltaje en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 (Roger *et al.*, 2003), que era bloqueada con concentraciones micromolares de TTX ($IC_{50} = 1.78 \pm 0.22 \mu\text{M}$; bloqueo total con 30 μM), y presentaba cinéticas similares a las reportadas para el canal de sodio expresado en corazón, por lo que los autores postularon a la subunidad Na_v1.5 como el potencial sustrato molecular para el transporte de la corriente de sodio registrada. Sin embargo, en ese reporte no se estudió la identidad molecular del canal Na_v expresado en cáncer de mama. En un estudio posterior, Fraser y colaboradores (Fraser *et al.*, 2005) comprobaron que el canal Na_v sobre expresado en el cáncer de mama es Na_v1.5, tanto en líneas celulares altamente metastásicas (MDA-MB-231), como en biopsias de pacientes con metástasis en nódulos linfáticos. Interesantemente, el canal Na_v1.5 expresado en estas muestras corresponde a la isoforma neonatal, generada por proceso alternativo del mRNA, que difiere de la isoforma adulta en la sustitución de siete aminoácidos comprendidos entre el segmento S3 y S4 del dominio I de la subunidad α del canal (Onkal *et al.*, 2008). En el mismo trabajo también se analizó la expresión de corrientes de sodio activadas por voltaje en líneas celulares de cáncer de mama con pobre o nulo comportamiento metastásico; los resultados mostraron que dichas células no expresan corrientes de sodio, lo que reforzó la evidencia de que existe una relación positiva entre la expresión funcional de canales Na_v y la capacidad invasiva de las células cancerosas (Fraser *et al.*, 2005) (**Figura 7**).

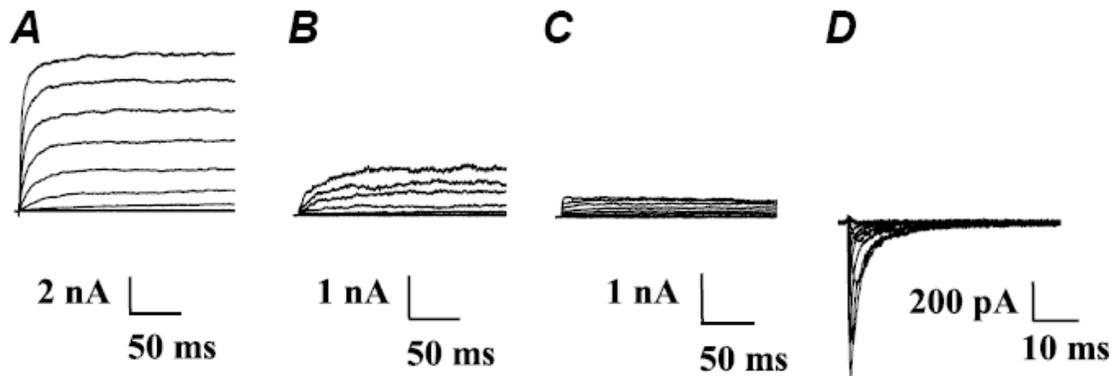


Figura 7. Corrientes iónicas activadas por voltaje en líneas celulares de cáncer de mama. A) MCF-10A, **B)** MCF-7, **C)** MDA-MB-468 y **D)** MDA-MB-231. Las corrientes fueron generadas con pulsos despolarizantes de 200 ms desde -60 mV a 60 mV con incrementos de 5 mV, a partir de un potencial de mantenimiento de -100 mV. Los pulsos se aplicaron cada 20 segundos. Se muestra claramente que solo las células altamente invasivas expresan corrientes entrantes de sodio activadas por voltaje (panel **D**) (Modificada de Fraser *et al.*, 2005).

La hipótesis sobre la potenciación de la capacidad invasiva de células cancerosas asociada a la expresión de canales Na_v ha sido comprobada mediante estudios posteriores en diferentes tipos de cáncer como leucemia (Fraser *et al.*, 2004), neuroblastoma (Ou *et al.*, 2005), mesotelioma (Fulgenzi *et al.*, 2006), cáncer de pulmón (Onganer & Djamgoz, 2005; Roger *et al.*, 2007), de colon (House *et al.*, 2010), y de ovario (Gao *et al.*, 2010). Adicionalmente, en un estudio en el que se transfectó el canal $Na_v1.4$ en células de cáncer de próstata con distintos potenciales metastásicos, se evidenció un incremento de la capacidad invasiva en todas ellas (Bennett *et al.*, 2004). Aún más relevante, en un estudio *in vivo* realizado recientemente en ratas Copenhagen inoculadas subcutáneamente con células Mat-Ly-Lu, se observó que el número de metástasis pulmonares disminuía ~40% al bloquear la actividad de los canales Na_v al aplicar TTX directamente en los tumores primarios (1-8 ml, 200 nM); además el tratamiento incrementó significativamente la supervivencia de los animales que desarrollaron tumores secundarios (Yildirim *et al.*, 2012).

Canales Na_v en CaCu

Mediante experimentos electrofisiológicos y de biología molecular, nuestro laboratorio reportó por primera vez la presencia de corrientes de sodio activadas por voltaje sensibles a la TTX, en células derivadas de cultivos primarios de CaCu; lo que se correlacionó con la detección de la expresión del RNA mensajero de subunidades α que codifican para los canales Na_v1.2, Na_v1.4, Na_v1.6, y Na_v1.7. Relevantemente, en biopsias control (tejido cervical no canceroso) la expresión de canales Na_v se limitó únicamente a la subunidad Na_v1.4 (explorado mediante RT-PCR de punto final), sugiriendo una expresión diferencial de los canales Na_v entre tejido sano y canceroso (Diaz *et al.*, 2007). Los antecedentes reportados en la literatura sobre la expresión de canales iónicos en el CaCu se encontraban limitados a la presencia de canales de cloruro activados por volumen (Shen *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 2000), y canales de potasio dependientes de voltaje (Suzuki & Takimoto, 2004; Farias *et al.*, 2004).

En una etapa previa a la presente tesis, se determinó por qPCR la abundancia relativa del mRNA de todas las subunidades α sensibles a la TTX; así como de las cuatro subunidades β de los canales Na_v, empleando β -actina como gen normalizador. Se encontró que todas las subunidades estudiadas son expresadas a nivel de mRNA en el cérvix uterino canceroso y no canceroso. De manera importante, la subunidad Na_v1.6 fue la que incrementó en mayor proporción su expresión en células de CaCu, con respecto al cérvix no canceroso (CNC), tanto en células derivadas de cultivos primarios, como directamente en biopsias de CaCu (Hernández Plata, 2008). Estas observaciones preliminares condujeron a profundizar, mediante los experimentos de la presente tesis, en el análisis de la expresión funcional de los canales Na_v1.6 en células de CaCu; así como evaluar si su actividad estaba relacionada con la capacidad invasiva de este tipo de cáncer.

HIPÓTESIS

La sobre expresión de los canales $Na_v1.6$ en células de cáncer cervicouterino contribuye a su capacidad invasiva.

OBJETIVOS

- Establecer los niveles de expresión de $Na_v1.6$ en muestras de CaCu positivas a VPH-16, utilizando a HPRT1 como gen normalizador.
- Investigar por inmunohistoquímica la localización de las proteínas $Na_v1.6$ y $Na_v1.7$ en cortes histológicos de cérvix canceroso y no canceroso; así como en células derivadas de cultivos primarios de CaCu.
- Evaluar la participación de los canales $Na_v1.6$ en la generación de la corriente total de sodio activada por voltaje en células de CaCu.
- Determinar la contribución de la expresión de $Na_v1.6$ en la capacidad invasiva de células de CaCu.
- Desarrollar una estrategia lentiviral para disminuir la expresión de canales $Na_v1.6$ en células de CaCu.

MATERIALES Y MÉTODOS

Biopsias

En colaboración con el Dr. Jaime Berumen (Unidad de Medicina Genómica, Hospital General de México), se obtuvieron biopsias de las cuales se extrajo el RNA total de pacientes con cáncer cervicouterino invasivo en distintos estadios de progresión de acuerdo a la clasificación de la International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) (Quinn *et al.*, 2006), diagnosticadas en la Unidad de Oncología del mismo hospital. Únicamente se incluyeron muestras positivas a VPH-16 de pacientes que no habían recibido ninguna terapia anticancerígena, ni tratamiento quirúrgico alguno. Asimismo, se incluyeron muestras de cérvix no canceroso (CNC), provenientes de hysterectomías por patologías ginecológicas no cancerosas realizadas a pacientes cuya evaluación de presencia de cáncer, por Papanicolaou, fue negativa. En ambos casos, la extracción del RNA total se realizó con el reactivo de trizol (Invitrogen). El protocolo del estudio fue aprobado por el comité institucional de ética para la investigación con muestras humanas, y en todos los casos se obtuvo un consentimiento escrito informado de los pacientes.

Cultivos celulares de biopsias de CaCu

En el presente estudio se utilizaron cultivos celulares establecidos a partir de alícuotas congeladas de células de cultivos primarios derivados de biopsias de cáncer cervicouterino denominados 085, 354 y JP, establecidos originalmente en el laboratorio del Dr. Javier Camacho (Departamento de Farmacología, Cinvestav-IPN). El linaje epitelial de estas células fue demostrado mediante el análisis de la expresión de citoqueratinas y el gen E7 del VPH-16 (Farias *et al.*, 2004), y la expresión de corrientes de sodio activadas por voltaje fue caracterizada en un trabajo previo de nuestro grupo de investigación (Diaz *et al.*, 2007). Las células fueron descongeladas y sembradas en cajas de cultivo de 100 mm con medio DMEM suplementado, con 1 mM de piruvato de sodio, 25 mM de HEPES, 10% de suero fetal bovino (SFB), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina, y mantenidas en incubación a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Después de 6 a 7 días, cuando la confluencia celular en las cajas fue cercana al

80%, los cultivos fueron regenerados de la siguiente manera. Las células se despegaron e individualizaron mediante la adición de 1 ml de tripsina (0.05%, y 0.53 mM de EDTA en solución balanceada de Hank libre de Ca^{2+} y Mg^{2+}), a la caja de cultivo, misma que se incubó por 5 min a 37°C, después de los cuales las células se disgregaron mecánicamente con la ayuda de una pipeta serológica de 10 ml. Una alícuota del 10% del total de células se resembró en una caja petri nueva de 100 mm de diámetro. Para los fines de registro electrofisiológico, se sembró una alícuota de 300 a 500 μl de la suspensión celular en pedazos de cubreobjetos colocados en el fondo de cajas de cultivo celular de 35 mm. Los experimentos de *patch clamp* fueron llevados a cabo con estas células, generalmente de 2 a 24 hrs después de haberlas sembrado. Los cultivos fueron utilizados solamente después de un máximo de tres pasajes después de haber sido descongelados, para evitar cambios adicionales debidos a las condiciones de cultivo *in vitro*.

Extracción de RNA

El RNA total de las células derivadas de cultivos primarios, así como de las biopsias de CaCu (tres de ellas correspondientes al estadio IB, tres al IIB, dos al IIIB y solo una al IVB), fue aislado con el kit NucleoSpin RNA II (BD Biosciences Clontech), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, al observar una confluencia en las cajas de cultivo del 80%, las células fueron lisadas incubándolas con una solución que permitió inactivar a las RNasas así como la adsorción del RNA a la sílica presente en las columnas del kit. Se realizó un tratamiento con DNasa I, para eliminar cualquier molécula de DNA contaminante; posteriormente la columna fue lavada y el RNA fue eluído adicionando 100 μL de agua libre de RNasas.

El RNA total de las biopsias de CaCu y CNC fue aislado con el reactivo Trizol (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de RNA en todas las muestras fue determinada por espectrofotometría en un Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies); posteriormente la integridad del RNA de las muestras fue corroborada mediante el patrón de migración de los RNAs ribosomales 18s y 28s en geles de agarosa al 1% (**Figura 8**). Finalmente, se prepararon alícuotas de cada muestra para evitar el deterioro del RNA por ciclos de congelación-descongelación y se almacenaron a -70°C hasta su uso posterior.

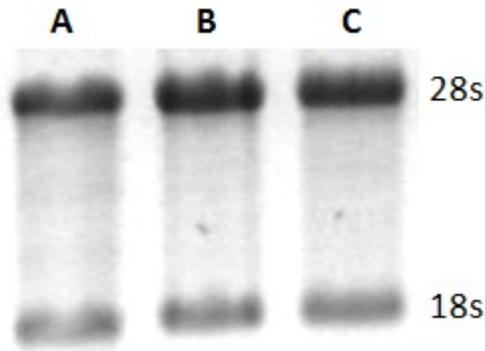


Figura 8. Separación electroforética de muestras de RNA extraídos de células derivadas de cultivos primarios de CaCu. Para comprobar la integridad de las muestras, se cargó en cada carril $\sim 1 \mu\text{g}$ de RNA total y se separó por electroforesis en geles de agarosa al 1% en TBE 0.5X, teñidos con bromuro de etidio. La imagen corresponde a tres alícuotas diferentes de RNA extraídos de células derivadas de los cultivos primarios de CaCu denominados 085 (A), 354 (B) y JP (C). La definición de las fracciones del RNA ribosomal 28s y 18s reflejan la integridad de las muestras.

Reacciones de PCR en tiempo real (qPCR)

A partir de $3 \mu\text{g}$ de RNA total se sintetizó el cDNA de cada muestra empleando el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Las reacciones se realizaron en un volumen final de $20 \mu\text{l}$, conteniendo, además del RNA, $1 \mu\text{l}$ de la transcriptasa reversa MultiScribe, $2 \mu\text{l}$ de amortiguador para la enzima, $0.8 \mu\text{l}$ de dNTPs 25X (100 mM), $2 \mu\text{l}$ de *random primers* (oligonucleótidos de 6 a 10 pb de secuencia aleatoria), $1 \mu\text{l}$ de inhibidor de RNasas, y H_2O suficiente para un volumen de $20 \mu\text{l}$. Las mezclas fueron sometidas a un programa térmico que consistió de tres etapas: un primer paso de 10 min a 25°C , seguido de 120 min a 37°C , y finalizado con 5 s a 85°C . El cDNA resultante se almacenó a -20°C para su uso posterior.

Se estudiaron muestras de CaCu y CNC adicionales a las analizadas en una etapa previa del presente proyecto de investigación (Hernández Plata, 2008). Asimismo, se determinaron los niveles de expresión de subunidades α y β de canales Na_v que no habían sido exploradas

previamente, esto es, la subunidad Na_v1.5 en sus variantes neonatal y adulta, ambas sensibles a la TTX; y las cuatro subunidades β de los canales Na_v. Nuevamente, en todos los casos se emplearon sondas TaqMan (Applied Biosystems) específicas para cada una de las subunidades (**Tabla 1**). Adicionalmente, se cuantificaron los niveles de expresión del gen HPRT1 en todas las muestras, para emplearlo como gen normalizador. Se realizaron rangos dinámicos correspondientes a cada sonda y se determinó la eficiencia de reacción de la siguiente manera: a cada producto directo de la transcripción reversa del RNA se le agregaron 20 μl de H₂O, y se prepararon cinco diluciones seriales: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32, mismas que se utilizaron para preparar reacciones de PCR en tiempo real usando cada ensayo (par de *primers* y sonda) correspondiente a cada gen. Cada reacción fue preparada por triplicado en un volumen final de 15 μl, conteniendo 3 μl de cDNA, 0.6 μl de ensayo, 3.9 μl de agua, y 7.5 μl de *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Las reacciones fueron distribuidas individualmente en placas multipozos de 96 y cubiertas con tapas plásticas adhesivas para ser sometidas a un programa de ciclado térmico que consistió de: un primer paso de 2 min a 50°C, seguido de 10 min a 95°C y finalmente de un paso de 45 ciclos consistentes a su vez de dos fases: 15 s a 95°C y 1 min a 60°C. El proceso de termociclado se realizó en un equipo para PCR en tiempo real ABI Prism 7300, acoplado a una computadora con el software SDS 1.2.2 (Applied Biosystems) para la adquisición y análisis de resultados. El valor promedio de C_T de la reacción de cada dilución se graficó contra la cantidad de cDNA empleada como molde y los puntos experimentales fueron ajustados a una recta por regresión lineal. Se obtuvo el valor de la pendiente y se sustituyó en la siguiente ecuación (ecuación de eficiencia de PCR): $E = 10^{(1/S)} - 1$, en donde *E* es la eficiencia de la reacción y *S* es el valor de la pendiente.

Una vez establecido el rango dinámico y la eficiencia de reacción de PCR de todos los ensayos, se decidió utilizar una dilución 1:4 del cDNA *stock* de todas las muestras, para cuantificar las diferencias en la expresión de todos los genes entre cada una de ellas. La amplificación de los productos de PCR específicos de cada gen fue detectada simultáneamente por triplicado en un mismo experimento para determinar un valor promedio de C_T (ciclo umbral) para cada grupo experimental. Cuando la variación fue mayor a 0.4 ciclos entre los distintos triplicados el ensayo

Tabla 1. Características de los ensayos TaqMan empleados en las reacciones de qPCR.

Subunidad	No. de acceso en <i>GenBank</i>	Secuencia de <i>primers</i> y sonda (5' → 3')	Tamaño de amplicón (pb)	Eficiencia (%)
Na _v 1.1	AB093548	F: GAGCAATGAGTATAGCCAGCATTCTA	81	95
		R: ACCAACAGGGTGGGCATTT		
		P: CTGCCTGGATTCTTCA		
Na _v 1.2	M94055	F: TGGTCATTTTCTTGGGCTCATTCT	83	85
		R: GGCCTGATTCTGTTCTCATAGG		
		P: CCACAGCCAAGATCA		
Na _v 1.3	NM_006922	F: AGACGCAATAGCAAAACAAGCATTT	76	92
		R: CAGCAAAGTCATTTTCAGATCCAACA		
		P: CCGACCTCTGAAACTG		
Na _v 1.5N	NM_001099404	F: TGTGATTATCATGGCGTATGTATCAGAAA	86	100
		R: TTAGAGCTCTCAGGACTCTGAAAGT		
		P: AAGAGCCGACAAATTG		
Na _v 1.5A	NM_198056	F: GTGGACCTGGGCAATGTCT	51	100
		R: GGCCCGGAGGACTCG		
		P: CAGCCTTACGCACCTTC		
Na _v 1.6	AY682081	F: GGGATCCATGGAAGTGGTTAGATTT	109	92
		R: GCTCGGAGAACCCTGAATGTT		
		P: CCCAGGTCCACAACT		
Na _v 1.7	X82835	F: GCAATGTTTCAGCTCTTCGAACTT	74	91
		R: CTTGAGCCTGGGATTACAGAAATA		
		P: TTTTCAAAGCTCTCAATACTC		
Na _v β1	NM_001037	F: GGAGGATGAGCGCTTCGA	70	97
		R: CAGATCCTGCAGGTCTTTGGT		
		P: CCCCGGCTGCCATT		
Na _v β2	NM_004588	F: TGCAGCCGGAGGATGAG	92	100
		R: GAGGACCTGCAGATGGATCTTG		
		P: CCCCTGACCGCCACCG		
Na _v β3	NM_018400	F: CGCCAGCCCCAGAAGAT	90	96
		R: CACAGGGAAGCAGACACTGA		
		P: TTTCCCCTGGCTTCTC		
Na _v β4	NM_001142349	F: AAGAAGTGGACAACACAGTGACA	93	100
		R: TGAGTTTCTTGATCAGCAGGATGAG		
		P: ACCCCGCCACGACAG		

F: *primer* sentido; R: *primer* antisentido; P: sonda; pb: pares de bases; Na_v1.5N: isoforma neonatal de Na_v1.5; Na_v1.5A: isoforma adulta de Na_v1.5.

fue realizado nuevamente. La normalización de los datos fue realizada utilizando el valor promedio de C_T del gen HPRT1 humano (C_T subunidad $Na_V - C_T$ HPRT1 = ΔC_t). Los valores de ΔC_t de las muestras de CaCu fueron normalizadas con respecto a las muestras de CNC (ΔC_t CaCu - ΔC_t CNC = $\Delta\Delta C_t$). Finalmente, los valores de $\Delta\Delta C_t$ fueron empleados en la ecuación $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para calcular los niveles relativos de expresión de los genes blanco en las muestras cancerosas (Livak & Schmittgen, 2001). La sonda TaqMan para HPRT1 forma parte de los controles endógenos comercialmente disponibles de Applied Biosystems, su eficiencia de amplificación fue del 100%.

Los fragmentos amplificados, fueron purificados en columnas del kit *Wizard®SV and PCR Clean-Up System* (Promega) y subclonados en el vector *pCR®8* del kit *GW/TOPO®TA Cloning* (Invitrogen), para corroborar su identidad molecular mediante reacciones de secuenciación automática realizadas en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

Inmunocitoquímica e Inmunohistoquímica

Las reacciones de inmunocitoquímica e inmunohistoquímica fueron realizadas en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, mediante una colaboración establecida con la Dra. Cindy Sharon Ortiz, y la M. en C. Brenda Marquina Castillo. Se realizaron pruebas basadas en reacciones inmunes en los tres cultivos primarios (085, 354 y JP), nueve biopsias de CaCu (en este caso, una de la etapa IIA, cuatro IB1, dos IB2, una IIB y una IIIB), y seis de CNC empleando anticuerpos policlonales anti- $Na_V1.6$ y anti- $Na_V1.7$ generados en conejo (Alomone Labs). Las células derivadas de cultivos primarios fueron fijadas con etanol absoluto, mientras que las secciones de biopsias fueron fijadas en una solución amortiguada con formaldehído al 4%. Las biopsias fueron embebidas en parafina y procesadas en condiciones estándar para histología. Secciones de 4 μ m de grosor se adhirieron a laminillas de vidrio Kling-On cargadas positivamente (Biocare Medical), posteriormente los cortes fueron desparafinados con xileno y etanol en concentraciones decrecientes. Después de lavar con PBS/Tween (pH 7.4), las secciones fueron inmersas en una solución de 10 mM EDTA (pH 8.0), y hervidas durante 30 min para inducir la recuperación antigénica. Después de bloquear la actividad de la peroxidasa endógena y proteínas inespecíficas con levamisol por 10 min, las secciones fueron incubadas

con los anticuerpos primarios contra Nav1.6 (1:150) o contra Nav1.7 (1:25), durante 60 min, seguidos de 10 min con el anticuerpo secundario (MACH 4 mouse probe; Biocare Medical), y finalmente 10 min con el polímero MACH 4 de peroxidasa de rábano (HRP). La actividad de la peroxidasa fue revelada mediante incubación de 4 min con 3,3-diaminobenzidina/H₂O₂ (Biocare Medical). Las secciones fueron contrastadas por incubación con hematoxilina (Dako) por 5 min. Las muestras con reacción positiva fueron observadas con una tinción café. Los controles de especificidad inmunohistoquímica fueron preparados de la misma forma, pero omitiendo los anticuerpos primarios. Como controles positivos se emplearon secciones de cerebro adulto. Finalmente, las muestras fueron montadas con resina permanente Entellan (Merck) y visualizadas en un microscopio Leica DM750. Las imágenes fueron tomadas con el software ImagePro plus v 7.0.1 o LAS EZ v.1.8.0 de Leica Microsystems.

Ensayos de migración e invasividad

Los ensayos de migración e invasividad con células de CaCu fueron realizados usando cámaras de Boyden con membranas de policarbonato conteniendo poros de 8 µm (BD Biosciences). En el compartimento superior (inserto) se sembraron 5 X 10⁴ células en medio de cultivo con 5% de SFB. El inserto fue sumergido en el compartimento inferior que contenía medio de cultivo enriquecido con 15% de SFB como quimioatrayente (**Figura 9**). Después de 72 h de incubación a 37°C, se estimó el número de células en el compartimento inferior, de acuerdo con la guía del fabricante. Las células que permanecieron en el compartimento superior fueron removidas con un hisopo de algodón y las células que pasaron del otro lado del filtro fueron teñidas para ser observadas al microscopio. Posteriormente, las células fueron lisadas para estimar su cantidad por densidad óptica a 570 nm en un lector ELX800 Universal Microplate (Bio-Tek Instruments). Para investigar la capacidad invasiva *in vitro* de las células de CaCu se emplearon ensayos de invasividad QCMTM de 24 pozos con filtros de 8 µm (Millipore). En estos ensayos, la cesta en la que son sembradas las células cuenta adicionalmente con un recubrimiento de colágeno en la parte superior del filtro, con el que las células tienen contacto directo, simulando la interacción con la matriz extracelular. Las células que fueron capaces de degradar la matriz de colágeno y migrar a través del filtro de 8 µm fueron consideradas invasivas.

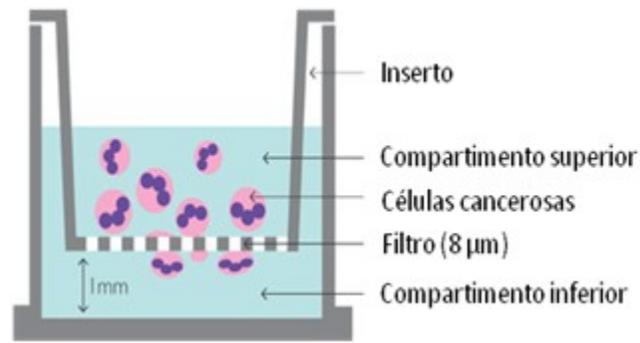


Figura 9. Esquema de la cámara de Boyden que ilustra el fundamento de los ensayos de migración e invasividad. Se sembraron 5×10^4 células en el compartimento superior, en presencia de medio de cultivo con 5% de SFB y el inserto se sumergió en el mismo medio de cultivo pero enriquecido con 15% de SFB, para estimular la movilidad celular. Al término del periodo de incubación, las células presentes en la parte inferior del filtro fueron teñidas y lisadas para estimar la proporción de éstas que fue capaz de pasar a través del filtro (migración) y previamente por una membrana de colágeno (invasividad).

Para evaluar el efecto de los bloqueadores de los canales Na_v en la capacidad invasiva de las células, se agregaron al compartimento superior de las cámaras de Boyden las toxinas TTX (6 μM) para bloquear a los canales sensibles a la TTX, o Cn2 (1 μM) para bloquear específicamente a $\text{Na}_v1.6$. Después de 72 h de incubación, la cantidad de células en la parte inferior de la cesta fue estimada de la misma forma descrita para los ensayos de migración. Se realizaron cuatro experimentos independientes, cada uno por duplicado y los resultados fueron normalizados a las condiciones control (sin la adición de toxinas). Para tener una estimación del número de células que migraron o invadieron, se generaron curvas de calibración con un número conocido de células sembradas en el mismo tipo de cajas de cultivo empleadas en los ensayos de migración e invasividad. Se observó una relación lineal entre la absorbancia y el número de células sembradas dentro del rango 1,500 a 25, 000 para las células de los cultivos primarios 085 y 354 (**Figura 10**).

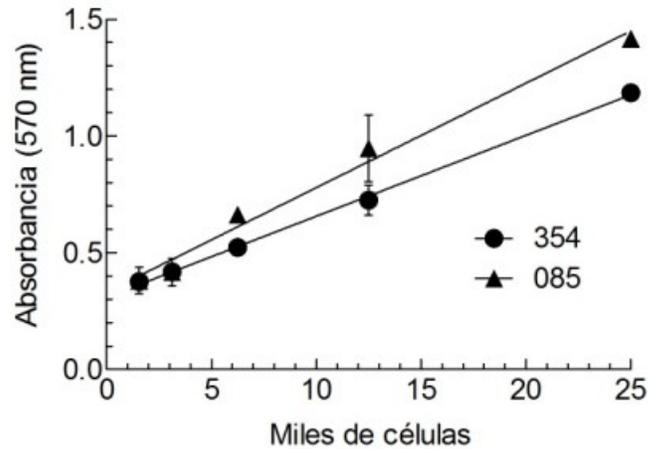


Figura 10. Curva estándar de calibración para células 085 y 354. Se sembraron diferentes cantidades de células en platos de 24 pozos por duplicado y después de cinco horas de incubación bajo condiciones estándar, las células fueron procesadas de la misma forma que en los ensayos de invasividad para mediciones de absorbancia. Los puntos experimentales fueron ajustados con funciones de regresión lineal (líneas sólidas). La absorbancia de las mediciones de los ensayos de migración e invasividad se encontraron en el rango de 0.6 a 1.2, lo cual es proporcional a una cantidad aproximada de 8,000 a 25,000 células en la curva de las células 354, y 6,000 a 19,000 células en la curva de las células 085.

Experimentos de *patch clamp*

El registro de la actividad de los canales Na_v de células de CaCu (cultivos primarios y líneas celulares), así como de células HEK-293 transfectadas, se llevo a cabo con la técnica de *patch clamp* en la configuración de célula completa (Hamill *et al.*, 1981; Marty & Neher, 1995). Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (21 – 23°C) empleando un amplificador Axopatch 200B, un convertidor Digidata 1322a A/D y el software pCLAMP 9.02 (Molecular Devices). Después de 2 h de incubación, las células sembradas en cubreobjetos fueron transportadas y colocadas en una cámara de registro de 150 μ l montada sobre la platina de un microscopio invertido equipado con epifluorescencia (Nikon). El cubreobjetos con células fue recambiado cada 60 min. Las células fueron perfundidas con una solución que contenía (en mM): 158 NaCl, 2 $CaCl_2$, 2 $MgCl_2$ y 10 HEPES-NaOH (pH 7.4), mientras que la solución interna (contenida en la pipeta de registro) contenía (en mM): 112 CsCl, 30 NaCl, 1 $CaCl_2$, 2 $MgCl_2$, 10 EGTA y 10 HEPES-CsOH (pH 7.3). La concentración osmolar de ambas soluciones fue

corroborada en un osmómetro VAPRO 5520 (Wescor, Inc.), y el valor promedio de al menos tres lecturas independientes fue de 315 mOsm y 300 mOsm para las soluciones externa e interna, respectivamente. La cámara de registro fue perfundida constantemente por gravedad a una velocidad aproximada de 1 ml/min, con excepción de los experimentos en los que se evaluó el efecto de las toxinas TTX y Cn2 en las células de CaCu 085, en los que se detuvo el flujo de la solución de baño y se agregó directamente a la cámara de registro el volumen necesario para alcanzar la concentración deseada en cada caso (ver **Figura 19**). Para los registros de corrientes de sodio de células transfectadas con canales Na_v (véase apartado de Transfecciones más abajo), la solución externa de registro fue modificada respecto a la descrita para los registros de las células de cultivos primarios; esto con la finalidad de disminuir la amplitud de las corrientes generadas por los canales transfectados, quedando de la siguiente manera la solución externa baja en sodio (nuevamente en mM): 60 NaCl, 96.5 cloruro de colina, 2 $CaCl_2$, 2 $MgCl_2$, y 10 HEPES-NaOH (pH 7.4), la solución interna utilizada fue la misma que se describió arriba.

Las pipetas de registro fueron generadas a partir de capilares de vidrio TW150-3 (WPI, Inc.), usando un estirador de pipetas modelo P-97 Flaming-Brown (Sutter Instrument Co.), acto seguido las puntas de éstas se pulieron al calor con una microforja (MF-830, Narishigue Co. Japón). Bajo estas condiciones, la resistencia de las pipetas fue típicamente de 3 a 4 M Ω . La resistencia en serie de la célula completa fue estimada a partir de la cancelación de los transitorios capacitivos con el circuito acoplado del amplificador, y fueron compensados eléctricamente en un 40 – 60%. El potencial de mantenimiento fue de -100 mV. Las señales de corriente fueron muestreadas usualmente a 50 kHz, seguidos de un filtrado analógico a 5 kHz utilizando el filtro del propio amplificador de *patch clamp*. En muchos de los casos, las corrientes fueron registradas en dos canales, uno con sustracción en línea de la corriente de fuga usando el método P/-5, y otro para evaluar la estabilidad de la célula y mantener la corriente. En las figuras de la presente tesis solo se muestran los datos con la corriente de fuga sustraída.

Los registros de corriente fueron analizados con la aplicación Clampfit del software pClamp 9.02, con éste se obtuvieron los valores de la corriente al pico de cada trazo de corriente y cuando fue el caso, se ajustaron con funciones exponenciales. Los valores promedio de los diferentes parámetros biofísicos analizados (amplitud, activación dependiente de voltaje, inactivación en el estado estacionario, y recuperación de la inactivación) se obtuvieron en Excel (Microsoft) y los gráficos finales fueron generados con Prism 5 (GraphPad). Para determinar la dependencia al voltaje de la activación de la corriente generada por los canales Na_v , los datos de las curvas $I-V$ se ajustaron con la siguiente ecuación de Boltzmann modificada:

$$I = I_{max}(V_m - V_{rev}) / (1 + \exp[(V_{1/2} - V_m)/k]) \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde I_{max} es la corriente máxima observada, V_m es el potencial de membrana, V_{rev} el potencial de inversión de la corriente, $V_{1/2}$ el voltaje al cual se alcanza el 50% de la I_{max} , y k es la pendiente de la relación. Todos los resultados cuantitativos son presentados en el texto y en las figuras como el promedio \pm el error estándar (EE). Las diferencias entre las medias aritméticas fueron definidas mediante una prueba t de *Student* y los datos fueron considerados significativos solo cuando $P < 0.05$.

Transfección de células HEK-293 y HeLa con canales Na_v

Los canales $Na_v1.5$, $Na_v1.6$ y $Na_v1.7$ (gentilmente donados por los Drs. Eduardo Salinas, Edward Perez-Reyes y Gail Mandel, respectivamente), fueron expresados en células HEK-293 y HeLa mediante transfecciones transitorias de los plásmidos correspondientes, empleando el reactivo JetPEI (Polyplus Transfection) como agente transfectante. Brevemente, se sembraron células HEK-293 y HeLa en placas de 35 mm a una confluencia aproximada del 60% y se incubaron por 24 h a 37°C con 5% de CO_2 . Las reacciones de transfección consistieron de dos soluciones: la solución A que contenía 2.5 μ g del DNA codificante para el canal de sodio de interés y 200 ng del DNA codificante para la proteína verde fluorescente; por su parte la solución B contenía 5 μ l del reactivo jetPEI. Ambas soluciones se llevaron a un volumen final de 100 μ L con NaCl 150 mM. Después de mezclar ambas soluciones en un vórtex por 10 s, la solución B se agregó gota

por gota a la solución A. La mezcla resultante se agitó vigorosamente en vórtex, se centrifugó a 13,000 rpm por 10 s y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Al término de este periodo de incubación, la mezcla se agregó por goteo a la caja de cultivo correspondiente y se incubó a 37°C con 5% de CO₂. A las 24 h de haber realizado la transfección, las células fueron tripsinizadas y una alícuota de aproximadamente 15% de la suspensión celular fue sembrada sobre cubre objetos para realizar registros electrofisiológicos 2 h después. Este procedimiento de siembra para registro electrofisiológico se repitió a las 48 y 72 h posteriores a la transfección.

Construcción de shRNAs contra Na_v1.6

Con la meta de profundizar en la caracterización del papel de los canales Na_v1.6 en la biología del CaCu, se desarrollaron RNAs de horquilla corta (shRNAs) para abatir la traducción del mRNA del gen SCN8A (Na_v1.6). La utilización de shRNAs como herramienta molecular nos permitió desarrollar distintos ensayos de biología celular, molecular y electrofisiología.

Para el desarrollo de los shRNAs dirigidos contra el canal Na_v1.6 (**Tabla 2**) realicé una estancia de 6 meses en el laboratorio del Dr. Edward Perez-Reyes, de la Universidad de Virginia en los Estados Unidos de América. Brevemente, las secuencias de nucleótidos fueron adquiridas comercialmente en forma de oligonucleótidos fosforilados en el extremo 5'. Para cada shRNA se sintetizó la secuencia reverso-complementaria para formar fragmentos de DNA de doble cadena. Para ello, se mezclaron 10 ng de cada par de *primers* (concentración final de 20 nM) junto con el amortiguador de la enzima ligasa T4; la mezcla se incubó a 95°C por 2 min, y después se sometió a una rampa de temperatura que bajó ésta a 25°C a una razón de -3°C/min; inmediatamente después, la mezcla se incubó en hielo por 5 min. Posteriormente, se agregó a la mezcla de reacción 10 ng de los *primers* ya linearizados, 20 ng del vector pLVUTHshGATA1-tTR-KRAB (No. de registro en Addgene: 11650) linearizado (con la enzima BsmBI) y desfosforilado, y 2U de ligasa T4. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 5 min seguido de 5 min en hielo. Esta reacción se utilizó para transformar bacterias químicamente competentes.

Tabla 2. Secuencia de shRNAs dirigidos contra Na_v1.6

shRNA			Secuencia sentido	Asa	Secuencia antisentido	
16D	F 5'-	GCGA	CCCATAAACTTCAACGAGAG	CTGTGAAGCCACAGATGGG	CTCTCGTTGAAGTTTATGGG	CTGC -3'
	R 3'-	CGCT	GGGTATTTGAAGTTGCTCTC	GACACTTCGGTGTCTACCC	GAGAGCAACTTCAAATACCC	GACG -5'
16E	F 5'-	GCGA	GTATTAACAGAGGGAAAA	CTGTGAAGCCACAGATGGG	TTTTCCCTCTGTTTAATAC	CTGC -3'
	R 3'-	CGCT	CATAATTTGTCTCCCTTTT	GACACTTCGGTGTCTACCC	AAAAGGGAGACAAATTATG	GACG -5'
16F	F 5'-	GCGA	GATTTATTGTCTCCCTCAGTT	CTGTGAAGCCACAGATGGG	AACTGAGGGAGACAATAAATC	CTGC -3'
	R 3'-	CGCT	CTAAATAACAGAGGGAGTCAA	GACACTTCGGTGTCTACCC	TTGACTCCCTCTGTTATTAG	GACG -5'
16G	F 5'-	GCGA	TCTCTTAGTCAGCCTTATAG	CTGTGAAGCCACAGATGGG	CTATAAGGCTGACTAAAGAGA	CTGC -3'
	R 3'-	CGCT	AGAGAAATCAGTCGGAATATC	GACACTTCGGTGTCTACCC	GATATTCCGACTGATTTCTCT	GACG -5'
16H	F 5'-	GCGA	CTTCTGAAATCCGATTTGAAA	CTGTGAAGCCACAGATGGG	TTTCAAATCGGATTCAGAAG	CTGC -3'
	R 3'-	CGCT	GAAGACTTTAGGCTAAACTTT	GACACTTCGGTGTCTACCC	AAAGTTTAGCCTAAAGTCTTC	GACG -5'
16I	F 5'-	GCGA	GTTATCCGATTGGCCGTATT	CTGTGAAGCCACAGATGGG	AATACGGGCCAATCGGATAAC	CTGC -3'
	R 3'-	CGCT	CAATAGGCTAACCGGGCATAA	GACACTTCGGTGTCTACCC	TTATGCCCGTTAGCCTATTG	GACG -5'
16S	F 5'-	GCGA	AGGTACCGTTAATCACACTGT	CTGTGAAGCCACAGATGGG	ACAGTGTGATTAACGGTACCT	CTGC -3'
	R 3'-	CGCT	TCCATGGCAATTAGTGTGACA	GACACTTCGGTGTCTACCC	TGTCACACTAATTGCCATGGA	GACG -5'

F: Secuencia sentido; R: Secuencia antisentido.

Las bacterias transformadas crecieron en placas de agar-medio Luria-Bertoni (LB) con ampicilina (100 µg/ml). Se eligieron algunas colonias para amplificar en medio LB líquido con ampicilina a la misma concentración, para amplificar el DNA plasmídico, el cual fue aislado empleando los reactivos del estuche *QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN). Posteriormente las construcciones fueron secuenciadas de forma automática para corroborar la correcta incorporación de cada shRNA. De esta manera se generaron 7 construcciones distintas como la que se esquematiza en la **Figura 11**.

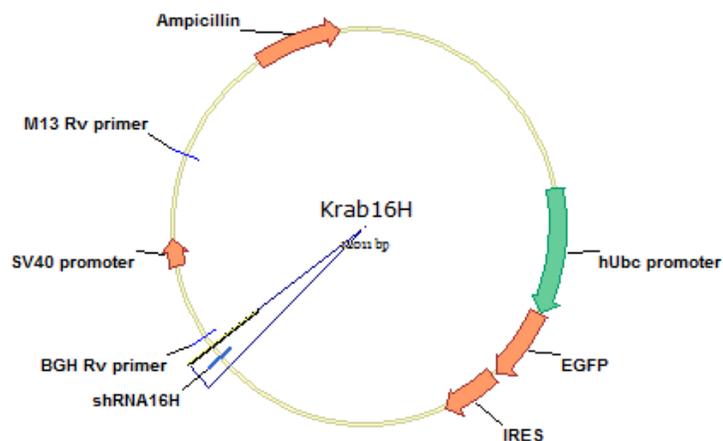


Figura 11. Esquema del plásmido que codifica para el shRNA16H. Se utilizó como esqueleto al plásmido pLVUTHshGATA1-tTR-KRAB en el que se ligaron las distintas secuencias que codifican para shRNAs dirigidos contra $Na_v1.6$ (16D a 16I), así como para una secuencia control sin blanco molecular en las células (denominada 16S) (ver Tabla 3). La secuencia nucleotídica de los shRNAs se encuentra bajo el control del promotor de ubiquitina y su transcripción fue inducida por la adición de doxiciclina (10 ng/ml) al medio de cultivo, al igual que el DNA codificante para la proteína verde fluorescente, que sirvió como indicador positivo de la expresión del plásmido. Este plásmido fue denominado Krab16H, por contener subclonado la secuencia del shRNA 16H. Utilizando la misma nomenclatura se designó el resto de los plásmidos que contenían los diferentes shRNAs.

La eficiencia de cada construcción para abatir los niveles del mRNA de $Na_v1.6$ fue evaluada, mediante su transfección junto con el DNA del propio canal $Na_v1.6$ en células HEK-293-FT (ATCC). Para realizar la transfección, una cantidad suficiente de las células HEK-293-FT fueron sembradas en placas de 12 pozos, de tal manera que alcanzaran una confluencia del ~60% a las 24 h de ser sembradas. Cada reacción de transfección fue preparada en un volumen final de 100 μ l e incluyó 300 ng del DNA del canal $Na_v1.6$, 1 μ g de cada construcción molecular de shRNA y 2.6 μ L de Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Las células transfectadas fueron incubadas por 48 h. Posteriormente se extrajo el RNA total con el kit *NucleoSpin RNA II*, de la manera descrita anteriormente. La concentración de las muestras fue determinada por espectrofotometría en un Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies). Cuando las muestras no fueron empleadas inmediatamente, éstas fueron almacenadas a -80°C hasta su uso. Se utilizó 1 μ g de RNA total para sintetizar cDNA, que sirvió como molde en reacciones de PCR en Tiempo Real para determinar la abundancia relativa del mRNA del canal $Na_v1.6$. Las reacciones de qPCR fueron realizadas por triplicado empleando los siguientes *primers*, F: 5'-GCTGCTGGTGTGTCTCATCT-3' y

R: 5'-AAAGCAGTAGTGGTACTTTCCCGC-3'; específicos para la secuencia de Na_v1.6 de humano (No. de acceso al GenBank: AF225988). En este caso, las reacciones de qPCR se llevaron a cabo utilizando el reactivo SyberGreen; así como el mismo programa de ciclado térmico descrito anteriormente. La expresión del gen GAPDH fue determinada en las mismas muestras, al mismo tiempo, para ser empleado como control endógeno en el análisis de datos, mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001), descrito anteriormente. Los resultados se muestran como el promedio de las reacciones realizadas de forma independiente \pm desviación estándar (DE).

Generación de lentivirus con shRNA contra Na_v1.6

En colaboración con Edgar Fernán González Buendía y Georgina Guerrero Avendaño, del laboratorio del Dr. Félix Recillas Targa, del Instituto de Fisiología Celular de esta Universidad Nacional, se generaron lentivirus empleando las construcciones moleculares de los shRNAs descritos en la sección anterior. Las partículas lentivirales fueron generadas empleando el sistema *ViraPowerTM Lentiviral Expression Systems* (Invitrogen) y las construcciones moleculares Krab16H y Krab16S, siguiendo las instrucciones descritas en el manual del usuario. Se sembraron 10×10^6 células HEK-293-FT con 20 ml de medio DMEM suplementado con SFB (10%), antibiótico y glutamina, en cajas de 150 mm 24 h antes de transfectar los DNAs codificantes para los shRNAs, la envoltura y las proteínas empaquetadoras virales. En la reacción de transfección se incluyeron los siguientes DNAs: 20 μ g de Krab16H o Krab16S, 10 μ g de DNA de envoltura viral y 10 μ g de DNA de proteínas empaquetadoras (pMD2.6 y psPAX2). Los DNAs se mezclaron en un tubo Falcon de 15 ml con 400 μ l de CaCl₂ 1.5 M, esterilizado por filtración y 1.5 ml de H₂O estéril, mezclando con agitación suave. Se agregaron 2 ml de HBS 2X a la mezcla de DNAs burbujeando al mismo tiempo con una pipeta Pasteur. Al terminar de agregar el HBS 2X se siguió burbujeando por 15 s más. Se agregó por goteo la mezcla sobre el medio de cultivo en las cajas con las células; se agitó cuidadosamente e inmediatamente se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Después de 10 – 12 h de incubación, se retiró la mezcla de reacción, se lavaron las células una vez con PBS, y por último se añadieron 16 ml de medio de cultivo completo. Las células se incubaron nuevamente 37°C con 5% de CO₂. y después de 36 – 48 h del inicio de la transfección se colectó el sobrenadante de las cajas tratadas con la misma mezcla de DNA en un

tubo Falcon de 50 ml y se centrifugó a 2,000 rpm por 7 min a 4°C para precipitar cualquier resto celular o agente contaminante. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos de ultracentrífuga para el rotor SW-28 (Beckman Coulter) y se centrifugó a 25,000 rpm por 160 min a 4°C. El sobrenadante se desechó en una solución acuosa de cloro al 10%, y los tubos se colocaron boca abajo en una gradilla con toallas absorbentes por ~10 min. Posteriormente, se agregaron 50 µl de PBS a 4°C, pH 7.4 al pellet de cada tubo, se sellaron con parafilm y se incubaron toda la noche a 4°C. Las partículas lentivirales se resuspendieron pipeteando cuidadosamente ~ 15-20 veces con el PBS contenido en los tubos. Finalmente, se prepararon alícuotas de 20 µl c/u, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a -80°C.

Transducción de células de CaCu con lentivirus 16H y 16S

Los lentivirus que contenían a los shRNAs Krab16H y Krab16S fueron denominados lentivirus 16H y lentivirus 16S, respectivamente, y fueron empleados en la transducción de células HeLa para comprobar su eficiencia. Brevemente, se sembraron 50 mil células en pozos de 35 mm (placas multipozos de 6), 24 h antes de ser infectadas. Se preparó una solución con las partículas virales en medio de cultivo sin suero agregando una alícuota de partículas virales (20 µl) a 980 µl de medio de cultivo, se mezcló por inversión 6 – 8 veces. Se retiró el medio del cultivo celular de las placas, se agregaron 500 µl de medio fresco sin suero, y posteriormente se agregó la solución viral correspondiente. Se mezcló pipeteando cuidadosamente 3 veces y se incubó toda la noche a 37°C con 5% de CO₂. Se aspiró el sobrenadante con una pipeta y se desechó en solución acuosa con cloro al 10%. Se agregaron 2 ml de medio fresco y se incubó por 72 h, cambiando el medio de cultivo cada 24 h para promover la recuperación y proliferación celular. La expresión de los shRNAs fue inducida adicionando 2 µl de doxiciclina (Dox) 20 ng/µl al medio de cultivo; después de 72 h de incubación se observaron las células al microscopio para comprobar la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en las células infectadas. Posteriormente, las células fueron tripsinizadas y divididas en dos grupos para generar líneas estables con los lentivirus 16H y 16S. El grupo a) fue sembrado para su amplificación directamente en una caja de 35 mm con 2 ml de medio de cultivo, y el grupo b) fue empleado para seleccionar por citometría de flujo aquellas células que presentaron la señal de la GFP más

intensa, usando células HeLa sin infectar como control. Las células con fluorescencia verde intensa se sembraron en una placa de 35 mm con 2 ml de medio de cultivo. Después de 72 h las células de ambos grupos fueron tripsinizadas y transferidas a placas de 100 mm para su expansión. Al llegar a una confluencia del 80% (~48-72 h después) las células fueron tripsinizadas, resuspendidas en medio de congelación (DMEM, 20% de SFB y 10% de DMSO), y se prepararon alícuotas que se congelaron y almacenaron en nitrógeno líquido para su uso posterior.

Mediante un procedimiento similar se realizó la transducción de células CaCu354 para probar la efectividad del shRNA 16H sobre los canales $Na_v1.6$ expresados endógenamente por dichas células derivadas de cultivos primarios de CaCu. En este caso solo se utilizaron los lentivirus 16H para infectar las células CaCu354 y la expresión del shRNA inducida por Dox se evaluó a las 24, 48 y 72 h, mediante la observación de células con fluorescencia de la GFP. Al constatarse ésta, las células fueron tripsinizadas y una alícuota de 200 μ l fue sembrada en cubreobjetos para realizar registros electrofisiológicos con la técnica de *patch clamp*. El resto de las células fueron concentradas por centrifugación y lisadas para extraer RNA total con el reactivo Trizol. La concentración de RNA fue determinada mediante espectrofotometría en un Nanodrop ND-1000, y las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su uso posterior. Después de colectar las muestras de RNA a los diferentes tiempos de inducción con Dox, éstas fueron empleadas para sintetizar cDNA, para finalmente analizar mediante qPCR los niveles de mRNA de $Na_v1.6$, bajo las condiciones descritas anteriormente.

RESULTADOS

Niveles de mRNA de subunidades de canales Na_v en muestras de cérvix uterino: sobre expresión específica de Na_v1.6 en CaCu.

En una fase previa al presente trabajo de tesis (Hernández Plata, 2008) se cuantificó la expresión del gen que codifica para β -actina para ser utilizado en la normalización de los niveles de expresión de las subunidades de los canales Na_v, sin embargo, los resultados mostraron que β -actina se sobre expresa drásticamente en las muestras cancerosas estudiadas, lo cual está acorde con observaciones recientes en distintos tipos de cáncer (Guo *et al.*, 2013). Por esta razón, en el presente trabajo se determinaron los niveles de expresión del gen de la hipoxantina-fosfo-ribosil-transferasa 1 (HPRT1), para usarse como gen normalizador, el cual ha sido reportado como uno de los candidatos ideales para este tipo de estudios, por presentar bajas variaciones de expresión entre muestras sanas y cancerosas, así como entre muestras de distintos tipos de cáncer (de Kok *et al.*, 2005; Valente *et al.*, 2009). Los niveles transcripcionales de las subunidades α y β de los canales Na_v de interés, así como del gen de referencia HPRT1, fueron determinados por PCR tiempo real en los tres cultivos primarios de CaCu, así como en seis biopsias de CaCu y cinco de CNC.

Para fines comparativos se graficaron directamente los valores de Ct, asumiendo el mismo ciclo umbral para todos los genes evaluados. Es importante tener en cuenta que el valor de Ct es inversamente proporcional a la cantidad de RNA inicial presente en la muestra; es decir, a menor valor de Ct, mayor cantidad de mRNA. Muchos de los genes analizados en las muestras de CaCu y CNC mostraron valores de Ct que se ubican dentro de la categoría de niveles de expresión moderada (26 a 30 ciclos), incluyendo el gen de referencia HPRT1 (**Figura 12A**). Por otro lado, en muestras de CNC, los genes que codifican para las subunidades Na_v1.1, Na_v1.6 y Na_v1.7 mostraron valores altos de Ct (34 a 38), indicando niveles de expresión génica bajos. Sin embargo, es de llamar la atención que precisamente Na_v1.6 y Na_v1.7 presentaron una alta expresión en las muestras de CaCu, y mostraron las diferencias en niveles de expresión más grandes entre todas las subunidades analizadas (**Figura 12B**).

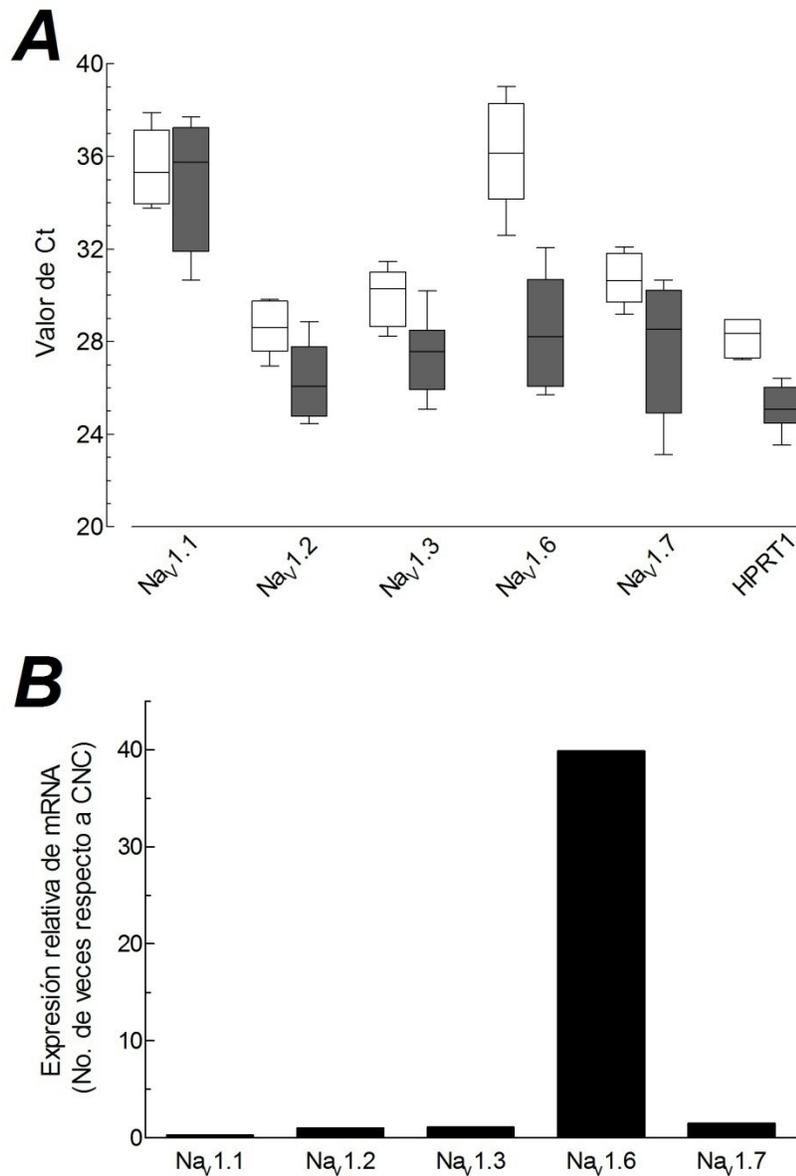


Figura 12. Niveles de expresión de las subunidades α de los canales Na_v en muestras de CaCu versus CNC. A) Niveles de mRNA de subunidades α de canales Na_v y HPRT1 en muestras de CaCu y CNC. Las cajas representan los cuartiles superior e inferior de los valores de ciclo umbral (Ct) con sus respectivas medianas, las barras representan los percentiles 10° y 90°. Las cajas blancas representan las muestras de CNC ($n = 5$), las grises las muestras de CaCu (cultivos primarios y biopsias; $n = 9$). **B)** Niveles relativos del mRNA de las subunidades α de los canales Na_v . Las barras muestran la diferencia en número de veces de los niveles de las subunidades α de los canales Na_v entre muestras de CaCu y CNC. La subunidad $\text{Na}_v1.6$ fue la que aumentó en mayor proporción en las muestras de CaCu, respecto a las biopsias de CNC.

Los experimentos de qPCR de la **Figura 12** muestran que las subunidades α sensibles a la TTX de los canales Na_v investigadas en el presente trabajo son expresadas a nivel de mRNA en el cérvix uterino, tanto canceroso como no canceroso. Las determinaciones cuantitativas de la expresión de mRNA mostraron que no hay diferencias significativas en los niveles de $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$ y $\text{Na}_v1.3$ entre muestras de CaCu y CNC; por el contrario, el mRNA de $\text{Na}_v1.6$ se encontró específicamente sobreexpresado en las muestras cancerosas (**Figura 12B**). En promedio, las determinaciones de qPCR revelaron que la expresión relativa del mRNA de $\text{Na}_v1.6$ en las muestras de CaCu fue de 40 veces mayor, en comparación con las muestras de CNC. Un análisis adicional en el que se separaron los datos de las muestras de los cultivos primarios y biopsias de CaCu comparando cada grupo por separado contra las muestras de CNC, demostró que la sobre expresión del canal $\text{Na}_v1.6$ fue más evidente en los cultivos primarios que en las biopsias de CaCu (**Figura 13**). Una posible explicación a esta diferencia puede ser que la población de células epiteliales que sobre expresan los canales se encuentra enriquecida en los cultivos primarios comparados con las biopsias de cérvix uterino (en las que existen otros tipos celulares como endoteliales, sanguíneas, etc.). No obstante, aún cuando las diferencias en los niveles de sobre expresión fueron claramente distinguibles entre cultivos primarios y biopsias, ambos grupos de muestras mostraron la misma tendencia en presentar niveles mayores de $\text{Na}_v1.6$.

La subunidad $\text{Na}_v1.4$, también clasificada como sensible a la TTX, presentó los valores de Ct más altos entre todas las subunidades de canales Na_v (38.4 ± 0.7 en CNC, $n = 6$; y 36.9 ± 1.4 en CaCu, $n = 9$). La escasa expresión de la subunidad $\text{Na}_v1.4$ en el tejido epitelial del cérvix es probablemente debida a que ésta es principalmente expresada en células musculares (Catterall *et al.*, 2005). Por lo anterior, esta subunidad no se estudió con mayor detalle en el presente trabajo.

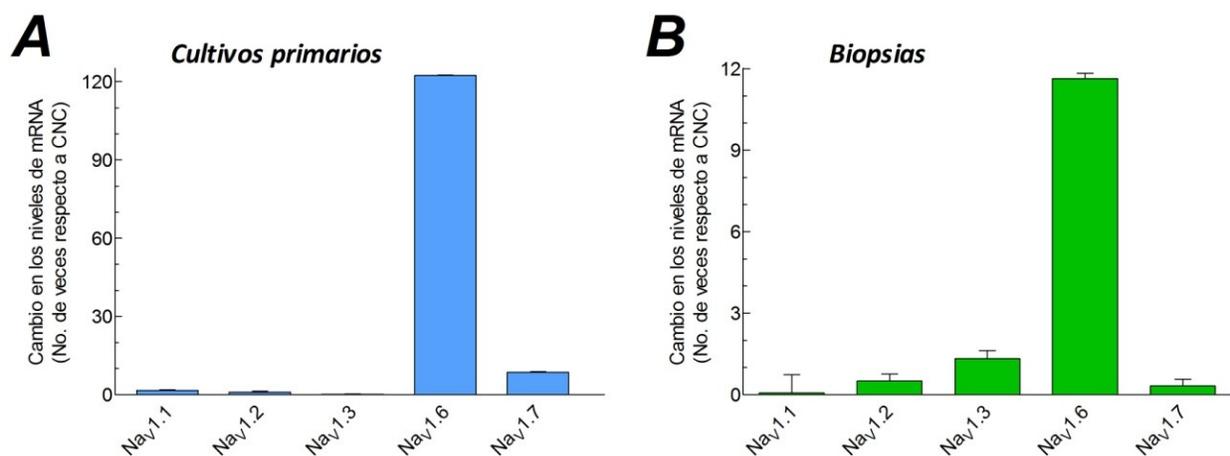


Figura 13. Sobre expresión de los niveles de mRNA de las subunidades α de los canales Na_v en CaCu. Los datos de la Fig. 12 fueron divididos en cultivos primarios (A) y biopsias de CaCu (B), para mostrar los niveles de sobre expresión por separado. Los niveles de expresión de todas las subunidades fueron normalizados con respecto a HPRT1. Nótese que en el caso de los cultivos primarios, los niveles de expresión son 10 veces mayores que en biopsias.

Las células de CaCu no expresan los canales resistentes a la TTX $\text{Na}_v1.5$

En el primer trabajo de nuestro laboratorio donde se reporta la presencia funcional de canales de sodio en cultivos primarios de CaCu, se presentaron evidencias electrofisiológicas de que la corriente de sodio total de las células de CaCu no presentaba un componente apreciable de corrientes de sodio resistentes a la TTX (Diaz *et al.*, 2007). No obstante, existe un número importante de reportes que han documentado la sobre expresión de la subunidad $\text{Na}_v1.5$, tanto en su versión neonatal ($\text{Na}_v1.5\text{-N}$), como adulta ($\text{Na}_v1.5\text{-A}$) en distintos tipos de cáncer (Brackenbury, 2012); por este motivo surgió el interés de evaluar la expresión de ambas subunidades a nivel de mRNA y proteína en las biopsias de CaCu. Para ello se diseñó una sonda TaqMan específica para cada isoforma y se evaluó la eficiencia de la reacción de PCR a partir de la generación de rangos dinámicos. Para evaluar la sonda $\text{Na}_v1.5\text{-N}$ se empleó cDNA sintetizado a partir de RNA total de células MDA-MB-231 (Figura 14), en las que se ha reportado una abundante expresión del canal (Fraser *et al.*, 2005). Para el caso de la sonda $\text{Na}_v1.5\text{-A}$, las diluciones seriales fueron generadas a partir del propio DNA que codifica para la subunidad $\text{Na}_v1.5$ (ver Materiales y Métodos).

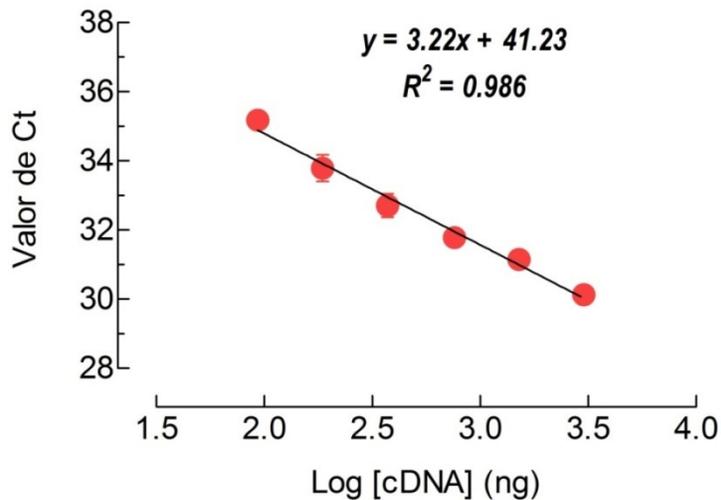


Figura 14. Determinación de la eficiencia de la reacción de qPCR con la sonda Na_v1.5-N mediante el empleo de un rango dinámico. Ajuste lineal de los valores de Ct (media \pm desviación estándar) correspondientes a cada reacción de qPCR realizada por duplicado, en las que se usaron diluciones seriales 1:2 del cDNA sintetizado a partir de 3 μ g de RNA total de células MDA-MB-231. Se presenta la ecuación de la recta generada con los parámetros obtenidos del ajuste. La eficiencia de reacción fue del 100% y se calculó con la ecuación $E = 10^{(1/S)} - 1$; en donde S es la pendiente de la recta generada por el ajuste de los puntos experimentales con una regresión lineal (Hernández Plata, 2008).

Los valores de Ct obtenidos a partir de experimentos de qPCR indicaron que los niveles de mRNA de las dos isoformas de Na_v1.5, neonatal y adulta, son prácticamente indistinguibles entre las muestras de CaCu y las de CNC (**Figura 15A**). No obstante, los niveles relativos de la subunidad Na_v1.5 de adulto son aproximadamente 10 veces más abundantes que los de la isoforma neonatal, ya que el Ct de esta última fue 3.3 unidades más grande que el de la subunidad adulta. Independientemente de la diferencia en abundancia entre ambas subunidades en CaCu, los niveles relativos de estas respecto al CNC fueron inferiores a la unidad (**Figura 15B**), lo que indica que ambas subunidades disminuyen su expresión en el CaCu. Por otro lado, empleando un anticuerpo específico para la subunidad Na_v1.5 en experimentos de inmunohistoquímica, se corroboró la ausencia de la proteína de ambas subunidades en cortes histológicos de biopsias de CaCu de distintas etapas de desarrollo (**Figura 15C**, Fotos **a** y **b**).

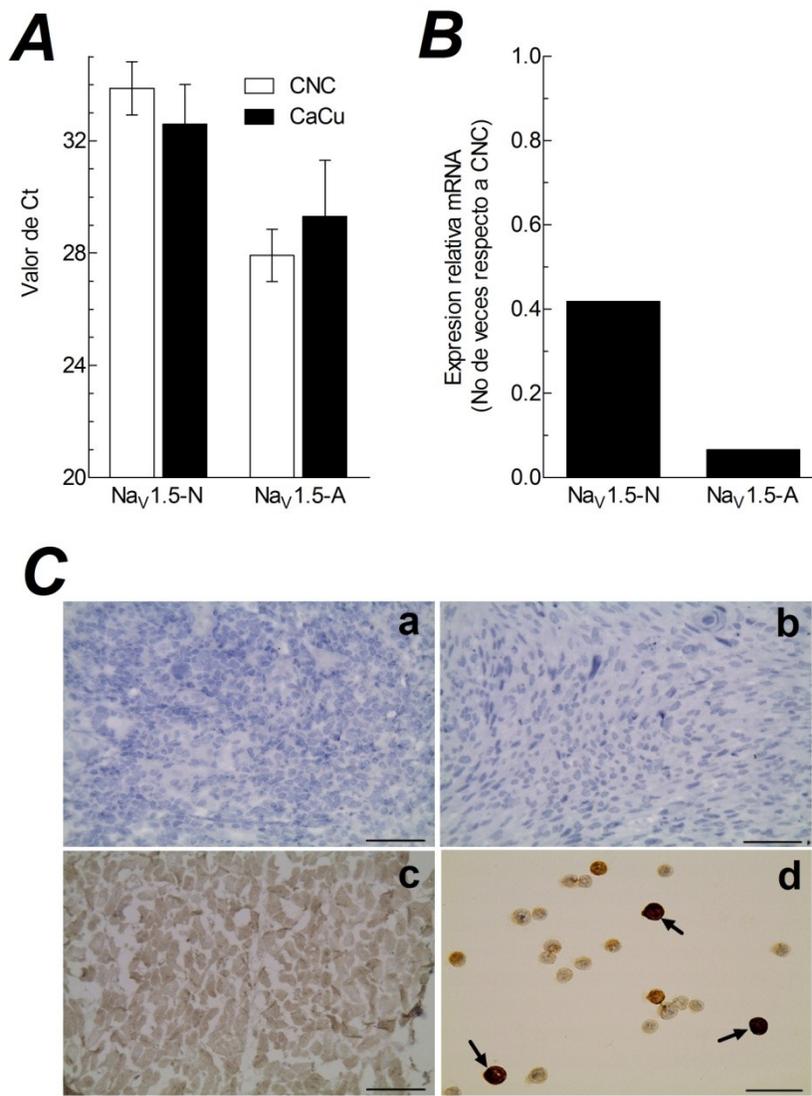


Figura 15. La proteína del canal Na_v1.5 no es expresada por las células de CaCu. A) Valores de Ct (media ± EE) de los niveles de mRNA de las isoformas neonatal (Na_v1.5-N) y adulta (Na_v1.5-A) del canal Na_v1.5 en muestras de cáncer cervicouterino (CaCu; *n* = 9) y cérvix no canceroso (CNC; *n* = 6). La determinación de la abundancia relativa por qPCR se realizó usando los *primers* y sondas de la Tabla 1. **B)** Cambio en número de veces de la abundancia relativa de las dos isoformas del canal Na_v1.5 en muestras de CaCu *versus* muestras de CNC. Los valores de Ct de las isoformas de la subunidad Na_v1.5 fueron normalizados con los valores respectivos de HPRT1. Ambas isoformas mostraron niveles menores de mRNA en las muestras de CaCu con respecto al CNC. **C)** Ausencia de inmunorreactividad de la proteína del canal Na_v1.5 en cáncer cervicouterino. Secciones de biopsias de CaCu de las etapas FIGO IIIB (a) y IIB (b). Nótese la ausencia de inmunorreactividad para Na_v1.5. Por el contrario, las secciones de corazón humano (control positivo) presentaron una fuerte tinción para la proteína Na_v1.5 (c). Como control adicional, la expresión del canal Na_v1.5 fue inducida en células HeLa mediante transfección transitoria, lo cual generó una inmunorreactividad robusta de la proteína del canal Na_v1.5 (mostrado con flechas). Las barras de escala representan 50 μm.

Como controles positivos de las reacciones inmunológicas se utilizaron cortes de corazón humano (Foto **c**); así como células HeLa transfectadas con la subunidad $\text{Na}_v1.5$ contenida en el plásmido pcDNA3 (Foto **d**).

Las células HeLa transfectadas con el DNA del canal $\text{Na}_v1.5$ fueron sometidas a experimentos de *patch clamp* para corroborar la expresión funcional de los canales de sodio transfectados transitoriamente. Las células HeLa no expresan canales Na_v endógenos (Sánchez-Sandoval, 2013), por lo que no evidenciaron corrientes de sodio activadas por voltaje (**Figura 16A**), mientras que todas las células HeLa transfectadas y estudiadas con la técnica de *patch clamp* generaron corrientes de sodio prominentes (5.4 ± 2.0 nA; $n = 7$), mismas que fueron bloqueadas en $\sim 80\%$ de su amplitud con $30 \mu\text{M}$ de TTX (**Figura 16B**). El bloqueo parcial con la toxina confirma la naturaleza resistente a la TTX de la corriente de sodio generada por los canales $\text{Na}_v1.5$.

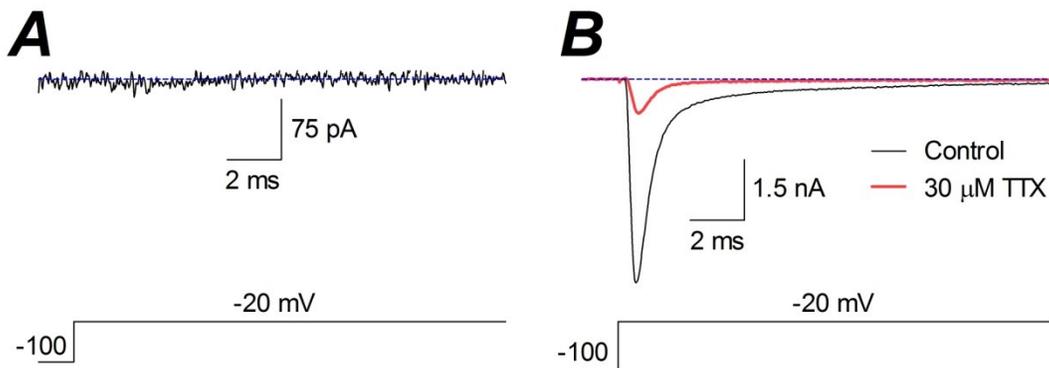


Figura 16. Corriente de sodio activada por voltaje en células HeLa transfectadas con el canal $\text{Na}_v1.5$. Antes de ser fijadas para los ensayos de inmunocitoquímica, algunas de las células transfectadas con el plásmido que codifica para el canal $\text{Na}_v1.5$ fueron empleadas para comprobar la expresión funcional del canal mediante experimentos de *patch clamp*. **A**) Señal de corriente registrada de una célula HeLa no transfectada en respuesta al pulso despolarizante que se ilustra al pie de la figura. La línea punteada azul representa el nivel cero de corriente (basal). Nótese que la corriente registrada (línea negra continua) es prácticamente una línea plana que no es diferente de la línea basal. **B**) Corrientes registradas de una célula HeLa transfectada con el canal $\text{Na}_v1.5$ en respuesta al protocolo de voltaje indicado. En rojo se muestra la corriente de sodio remanente después de exponer la célula a $30 \mu\text{M}$ de TTX, lo que refleja el carácter resistente de la subunidad $\text{Na}_v1.5$.

Expresión diferencial de subunidades $\text{Na}_v\beta$ en cultivos primarios y biopsias de CaCu

La expresión de subunidades $\text{Na}_v\beta$ ha sido implicada en procesos de extensión y adhesión celular en neuronas y células cancerosas (Brackenbury & Isom, 2008; Chioni *et al.*, 2009), por lo que se analizaron los niveles de mRNA de las cuatro subunidades β de los canales Na_v en muestras de cérvix uterino no canceroso y canceroso. Contrario a lo observado para los niveles de mRNA de las subunidades α , las subunidades accesorias β mostraron tendencias significativamente diferentes entre los cultivos primarios y las biopsias de CaCu, aunque $\text{Na}_v\beta 1$ siempre fue la subunidad más abundante con valores de Ct considerados como de expresión abundante ($\text{Ct} \leq 26$; **Figura 17A**). Haciendo una estimación a partir de los valores crudos de Cts de las subunidades $\text{Na}_v\beta$ (tanto de CaCu como de CNC), se encontró que se expresan de 10 a 1000 moléculas más de mRNA para la subunidad $\text{Na}_v\beta 1$ que para cualquier otra subunidad β . Además, esta subunidad fue la única que disminuyó en las biopsias de CaCu respecto a CNC (**Figura 17D**), mientras que en los cultivos primarios de CaCu sus niveles de expresión fueron muy semejantes a los de CNC (**Figura 17C**). Los datos de los paneles **B**, **C** y **D** de la **Figura 17** fueron obtenidos después de normalizar los valores de Ct de cada subunidad $\text{Na}_v\beta$ con los de HPRT1 (control endógeno), por lo que representan valores de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (cambio en el número de veces de los niveles de mRNA). Por su parte, $\text{Na}_v\beta 2$ y $\text{Na}_v\beta 4$ mostraron niveles de expresión bajos en los cultivos primarios de CaCu (Ct de ~ 34), aunque las muestras de CNC tuvieron valores más bajos (Ct ~ 30), es decir, los niveles de mRNA de ambas subunidades fueron ~ 15 veces más bajos en los cultivos primarios. Paradójicamente, el mensajero de ambas subunidades fue ligeramente (alrededor de 30%) más abundante en las biopsias de CaCu que en las de CNC (**Figura 17A y D**). En promedio, considerando tanto cultivos primarios como biopsias de CaCu, la subunidad $\text{Na}_v\beta 3$ fue la única que mostró una sobre expresión (aunque el aumento fue menos del 50%) en el CaCu en comparación con las muestras de CNC (**Figura 17B**). La comparación directa entre cultivos primarios de CaCu y biopsias de CNC evidencia una fuerte regulación negativa de la expresión de $\text{Na}_v\beta 2$ y $\text{Na}_v\beta 4$ en el CaCu (**Figura 17C**). Por el contrario, entre biopsias de CaCu y CNC no se detectaron cambios sustanciales en los niveles de expresión (cambios máximos del 100%) (**Figura 17D**). Una probable explicación para estas diferencias entre cultivos primarios y biopsias de CaCu puede estar relacionada a la función en adhesión

celular que ha sido asociada a las subunidades $\text{Na}_v\beta 1$ y $\text{Na}_v\beta 2$ (Brackenbury *et al.*, 2008; Brackenbury & Isom, 2008; Jansson *et al.*, 2012), una propiedad celular que puede ser diferente entre biopsias y cultivos primarios, dado el contexto celular y de componentes de matriz extracelular en el que se encuentran ambos tipos celulares.

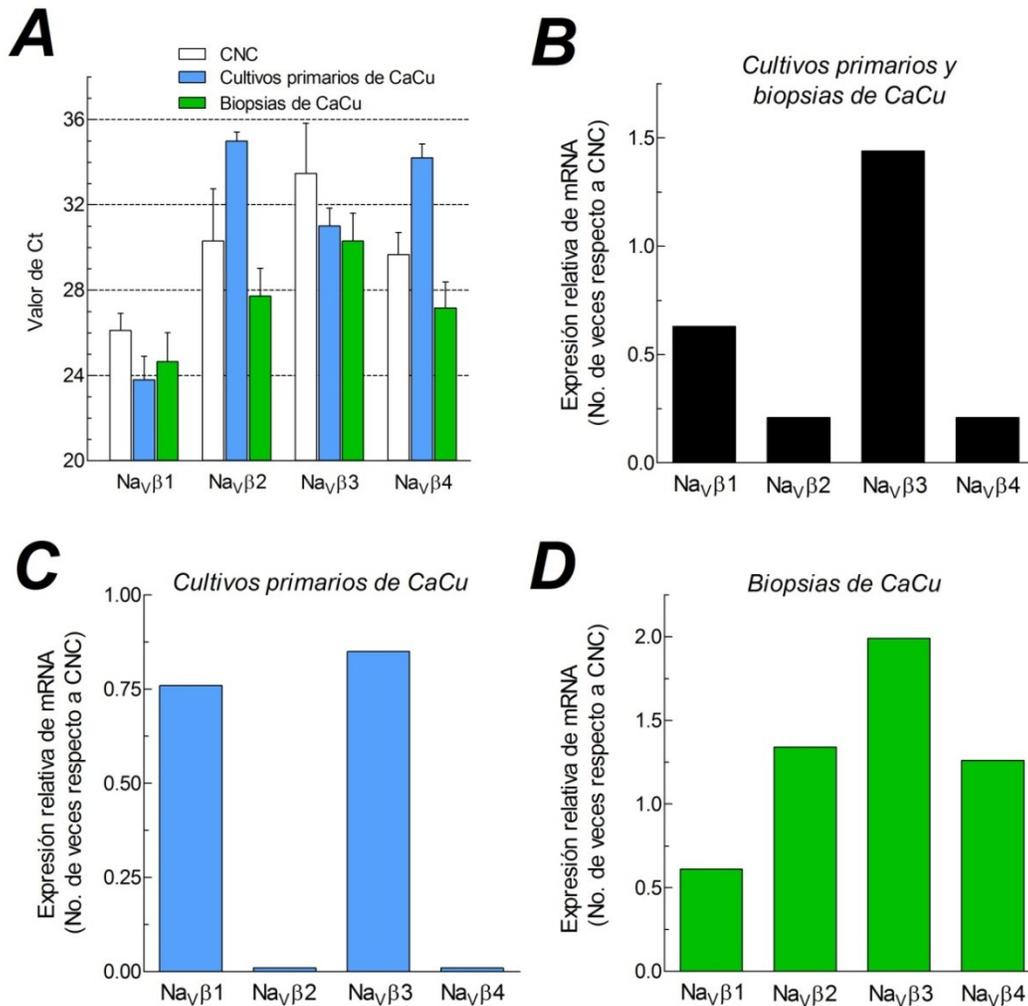


Figura 17. Cuantificación de los niveles de mRNA de las subunidades β de los canales Na_v en muestras de CaCu y CNC. **A**) Valores de Ct (media \pm DE) para las subunidades indicadas. Los datos se obtuvieron a partir de experimentos de qPCR, en los que se utilizó el cDNA de las mismas muestras utilizadas en la determinación de la abundancia relativa de las subunidades α de canales Na_v : biopsias de CNC ($n = 5$), biopsias de CaCu ($n = 6$) y cultivos primarios de CaCu ($n = 3$). Después de normalizar los valores de Ct de cada subunidad β con los de HPRT1 (control endógeno), se obtuvieron los valores de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ mismos que se grafican como el cambio de expresión en el mRNA en número de veces, respecto a CNC en CaCu, cultivos primarios y biopsias (**B**); cultivos primarios de CaCu (**C**) y biopsias de CaCu (**D**).

Localización de la proteína de las subunidades Na_v1.6 y Na_v1.7 en CaCu

Con el propósito de investigar si el aumento en la expresión del mensajero de las subunidades Na_v1.6 y Na_v1.7 observado en muestras de CaCu, se reflejaba a nivel de proteína se realizaron experimentos de inmunohistoquímica en secciones de biopsias de CNC ($n = 6$) y CaCu ($n = 9$), así como inmunocitoquímica en células derivadas de cultivos primarios ($n = 3$). Los resultados se presentan de manera resumida en la **Figura 18**. Aunque la proteína de ambas subunidades fue detectada en todas las muestras, el patrón de la inmunorreactividad reveló una diferencia importante entre los cortes de muestras de CNC y CaCu. La diferencia estribó en la localización de las proteínas de Na_v1.6 y Na_v1.7, la cual fue mayormente limitada a la membrana plasmática de las células de la capa media y la zona superficial del epitelio escamoso cervical en las secciones de CNC (**Figuras 18Aa y 18Ab**), mientras que en las biopsias de CaCu las proteínas estuvieron ampliamente distribuidas en la membrana plasmática y compartimentos citosólicos, es decir en prácticamente toda la célula (**Figuras 18Ac - Af**). No hubo diferencias obvias en la intensidad de la señal inmunológica entre biopsias de diferentes etapas de desarrollo del CaCu incluidas en el estudio (comparar fotos **Ac** y **Ad** contra fotos **Ae** y **Af** de **Figura 18**). Asimismo, conforme a lo esperado no se detectó inmunorreactividad alguna en las secciones de biopsias cuando se omitieron los anticuerpos primarios (**Figuras 18Ag y Ah**). De igual manera, las células de los tres cultivos primarios (085, 354 y JP) también mostraron una fuerte señal de inmunotinción para las proteínas Na_v1.6 y Na_v1.7 (**Figura 18B**). Así, la sobreexpresión de Na_v1.6 y Na_v1.7 detectada a nivel de mRNA (**Figura 12**), tiene una correlación positiva con una tinción relativamente mayor para la proteína de los canales en tejido canceroso comparada con muestras no cancerosas, y de manera más evidente hay un cambio en la localización celular de ambos canales, siendo más ubicua su presencia en las células de CaCu que en las de CNC.

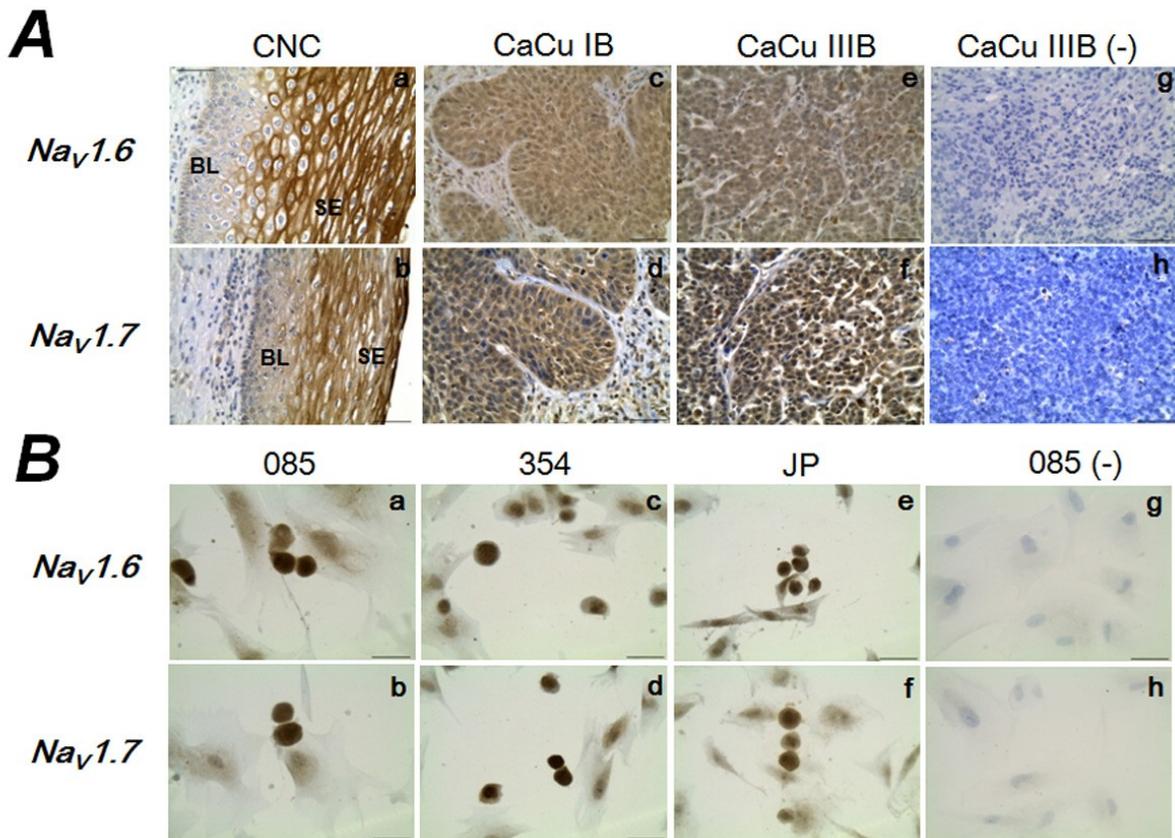


Figura 18. Inmunodetección de los canales $Na_v1.6$ y $Na_v1.7$ en muestras de CaCu. A) Tinción inmunohistoquímica en cortes de biopsias de CaCu para la detección de los canales $Na_v1.6$ y $Na_v1.7$. La tinción de ambos canales estuvo confinada principalmente a la membrana plasmática de las células localizadas desde la capa media hacia la capa superficial del epitelio escamoso cervicouterino (EE) en secciones de CNC (tinción café: Fotos **a** y **b**); la inmunorreactividad en la lámina basal (LB) fue débil para ambas proteínas. Por el contrario en biopsias de CaCu, la señal para los canales $Na_v1.6$ se observó ampliamente distribuida en la membrana plasmática, el citoplasma y el núcleo de la mayoría de las células de biopsias de CaCu de etapas FIGO IB (Foto **c**) y IIIB (Foto **e**). La inmunolocalización de $Na_v1.7$ mostró un patrón similar que $Na_v1.6$ aunque la señal aparente en núcleo no fue consistente en todas las secciones (Fotos **d** y **f**). No se observó inmunorreactividad al omitir los anticuerpos primarios en los experimentos (Fotos **g** y **h**). Las imágenes son representativas de nueve biopsias de CaCu y seis de CNC. **B)** Inmunocitoquímica para detectar la expresión las proteínas de $Na_v1.6$ y $Na_v1.7$ en cultivos celulares de CaCu. Los cultivos primarios (085, 354 y JP) derivados de biopsias de CaCu presentaron inmunorreactividad para los canales $Na_v1.6$ (Fotos **a**, **c** y **e**) y $Na_v1.7$ (Fotos **b**, **d** y **f**). Del mismo modo, los controles negativos en donde se omitieron los anticuerpos primarios permitieron observar solamente los núcleos teñidos con hematoxilina (Fotos **g** y **h**). La línea de la escala representa 50 μ m.

Contribución de los canales Na_v1.6 a la corriente de sodio total de las células de CaCu

El siguiente objetivo consistió en investigar si la sobreexpresión del mRNA que codifica para los canales Na_v1.6 y la fuerte inmunorreactividad detectada en las muestras de CaCu podía ser asociada con un componente de la corriente de sodio total detectada en las células cancerosas. Para tal fin se realizaron experimentos de *patch clamp* en la configuración de célula completa con células de los cultivos primarios de CaCu, cuya corriente de sodio había sido caracterizada previamente en nuestro laboratorio (Diaz *et al.*, 2007). Como una herramienta farmacológica para identificar la participación de los canales Na_v1.6 en la corriente total de sodio, se usó la toxina Cn2 que ha sido reportada como un bloqueador específico de los canales Na_v1.6 (Schiavon *et al.*, 2006; de la Vega & Possani, 2007). En la **Figura 19A** se muestra el bloqueo de la corriente total de sodio registrada a 0 mV en una célula del cultivo primario 085, debido a la presencia de 350 nM y 1 μM de la toxina Cn2 en la cámara de registro. En promedio, con una concentración de 350 nM de Cn2, la amplitud de la corriente de sodio se redujo en un 30.3 ± 5.0% ($n = 8$; **Figura 19B**). Aumentando la concentración de la toxina a 1 μM se logró bloquear una fracción adicional de la corriente de sodio (~18% adicional), de tal forma que el porcentaje total de bloqueo fue de 48.3 ± 6.9% ($n = 6$). No se emplearon concentraciones mayores de Cn2 para prevenir el bloqueo inespecífico de otros canales de sodio. En algunos casos, en las mismas células en las que se probó el efecto de la Cn2, también se comprobó que la corriente de sodio remanente fuera bloqueada totalmente con 1 μM de TTX (**Figura 19A**, trazo rojo), para confirmar la naturaleza sensible a la TTX de las corrientes de sodio expresadas por este tipo celular (Diaz *et al.*, 2007). Un bloqueo similar se observó cuando se realizó este mismo tipo de experimentos en células del cultivo primario 354 (datos no mostrados).

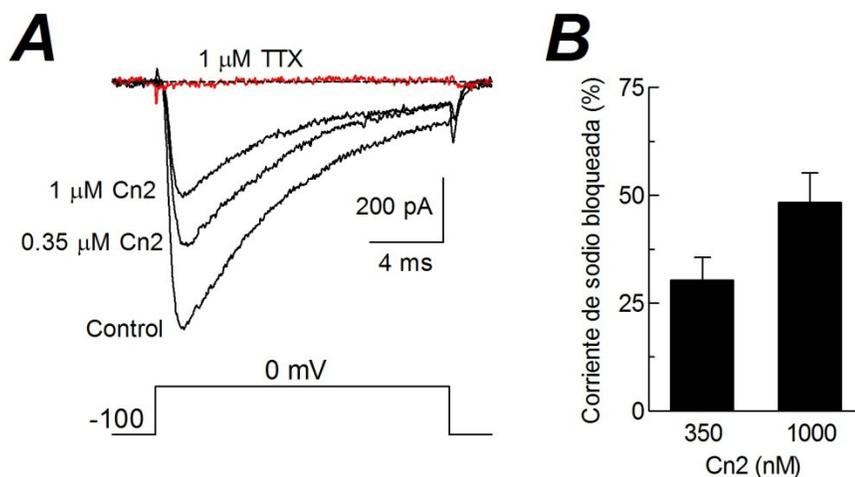


Figura 19. Contribución de los canales $\text{Na}_V1.6$ a la corriente de sodio de las células de CaCu. A) Corrientes de sodio representativas obtenidas de una célula del cultivo de CaCu 085. Los registros de corriente fueron evocados mediante el protocolo de voltaje ilustrado al pie de la figura bajo fijación de voltaje con la técnica de *patch clamp* en la configuración de célula completa. Después del registro de la corriente Control se aplicaron localmente las concentraciones indicadas de la toxina Cn2, y posteriormente $1 \mu\text{M}$ de TTX (trazo rojo). **B)** Porcentaje del bloqueo de la corriente de sodio con 350 nM y $1 \mu\text{M}$ de Cn2. Las barras muestran el promedio \pm EE ($n = 8$ y 6 , respectivamente). En todas las células investigadas la corriente resistente a Cn2 fue bloqueada en su totalidad con $1 \mu\text{M}$ de TTX.

Participación de los canales Na_V en el comportamiento metastásico de las células de CaCu

Una vez establecida la presencia y funcionalidad de los canales $\text{Na}_V1.6$ en las células de CaCu (tanto en biopsias como en cultivos primarios), la siguiente interrogante fue investigar si la actividad de los canales Na_V , en general, y $\text{Na}_V1.6$, en particular, participa en el comportamiento metastásico de las células de CaCu, es decir, si contribuye a los fenómenos de migración e invasividad celular. Para abordar esta pregunta se realizaron ensayos funcionales *in vitro* con las células de CaCu en presencia y ausencia de $6 \mu\text{M}$ de TTX y $1 \mu\text{M}$ de Cn2, concentraciones suficientes para bloquear totalmente a las subpoblaciones de canales Na_V sensibles a la TTX (Fraser *et al.*, 1999) y de manera específica a $\text{Na}_V1.6$ (Schiavon *et al.*, 2006). Primero se determinó la toxicidad de la TTX sobre la proliferación de los cultivos primarios 085, 354 y JP. En la **Figura 20** se muestra que la proliferación de las células de los cultivos celulares de CaCu 085 y 354 no fue afectada después de ser incubadas durante 72 h en presencia de la toxina a la

misma concentración empleada en los ensayos de movilidad e invasividad celular (6 μ M). Únicamente el cultivo JP presentó una disminución discreta (~20%) aunque significativa en el número de células vivas en presencia de la TTX.

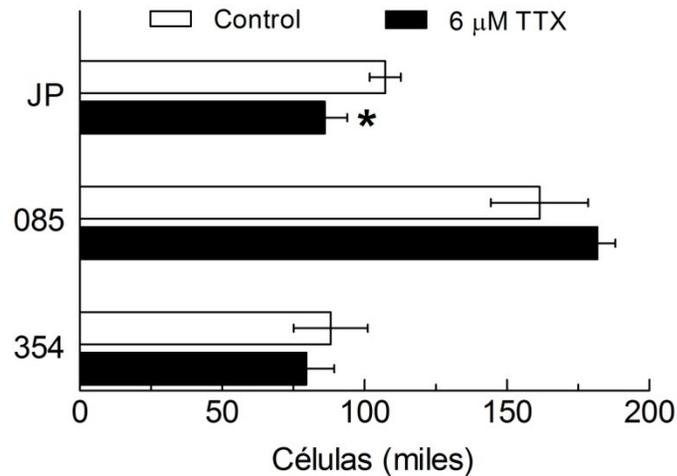


Figura 20. Determinación de toxicidad de la TTX para los cultivos celulares de CaCu. Número de células (media \pm DE; $n = 6$) vivas de los cultivos de CaCu indicados después de 72 h de incubación en ausencia (Control) o en presencia de 6 μ M de TTX. Los experimentos iniciaron con 50 mil células de cada cultivo y después de 72 h de incubación en condiciones estándar, en presencia o ausencia de TTX, las células fueron despegadas de las placas de cultivo mediante digestión enzimática con tripsina y se cuantificaron mediante una cámara de Neubauer. El análisis no pareado de las medias con la prueba de *t de Student* indicó que solo existen diferencias significativa en el cultivo JP, indicado con un * ($p = 0.0003$).

Tomando en consideración los resultados de proliferación, los ensayos de migración e invasividad fueron realizados empleando solamente los cultivos primarios 085 y 354. Además las células del cultivo 085 son las que presentan la densidad de corriente más grande de los tres cultivos, mientras que en el cultivo 354 la corriente expresada es casi la mitad del primero (20.4 ± 4.3 y 9.8 ± 2.0 pA/pF, respectivamente) (Díaz *et al.*, 2007). Como se muestra en la **Figura 21A**, la migración no fue modificada significativamente por la presencia de TTX o Cn2 en ninguno de los dos cultivos primarios. Por el contrario, la invasividad relativa de estas células fue modificada por la acción de cada una de las toxinas (**Figura 21B**). Después de 72 h de incubación con 6 μ M de TTX, la invasividad relativa de las células 085 mostró un decremento significativo comparado con la condición control (en ausencia de la toxina); la invasividad

normalizada disminuyó al $81.5\% \pm 5.6\%$. Aún más interesantemente, la toxina Cn2 ($1 \mu\text{M}$) tuvo un efecto similar sobre este mismo comportamiento celular. En las células 354 se observó la misma tendencia, la invasividad normalizada disminuyó a $79.5 \pm 7.6\%$ y $78.3 \pm 7.6\%$ con TTX y Cn2, respectivamente. Estos resultados sugieren que el bloqueo de los canales de sodio, y particularmente los canales $\text{Na}_v1.6$, reduce la invasividad relativa de las células de los cultivos primarios del CaCu.

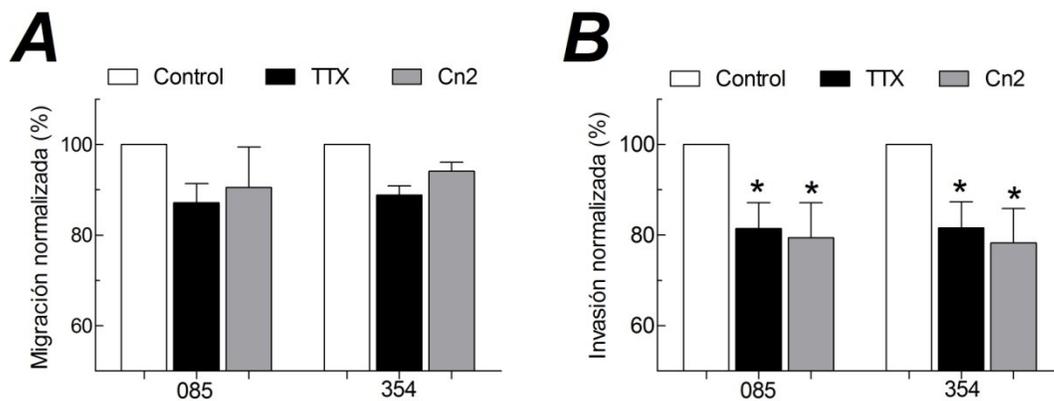


Figura 21. Contribución de los canales Na_v en la invasividad *in vitro* de cultivos primarios de CaCu Migración (A) e invasión (B) de células de CaCu en ausencia (Control) o en presencia de TTX $6 \mu\text{M}$ o Cn2 $1 \mu\text{M}$. Los valores de absorbancia (entre 0.6 y 1.2) de ambos ensayos fueron normalizados a las condiciones control y expresados como porcentajes. Las columnas representan los promedios de al menos tres experimentos independientes; las barras los errores estándar. Las diferencias significativas entre el grupo Control y los tratamientos con las toxinas se indican con un asterisco; $p < 0.001$ (ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Dunnett para medias).

Abatimiento de la expresión del canal $\text{Na}_v1.6$ mediante shRNAs

Con el propósito de generar una estrategia con potencial terapéutico basada en la observación de que el canal $\text{Na}_v1.6$ contribuye a la invasividad de las células de CaCu, durante la última etapa de mis estudios de doctorado (y en estrecha colaboración con el Dr. Edward Perez-Reyes de la Universidad de Virginia) se desarrolló una estrategia lentiviral para disminuir la expresión del mensajero del canal $\text{Na}_v1.6$ en las células de CaCu. Primeramente, se construyó un shRNA contra el mRNA del canal $\text{Na}_v1.6$. Dicho shRNA se subclonó en un vector cuya expresión es

inducible, de tal forma que pueda ser empleado en diversos estudios enfocados a investigar el papel del canal en la biología del cáncer.

Mediante un análisis de bioinformática se diseñaron y sintetizaron distintas clonas que codifican para shRNAs dirigidos a diferentes regiones del mRNA del canal $Na_v1.6$; mismas que fueron probadas mediante su transfección transitoria en células HEK-293-FT y posteriores ensayos de qPCR. En la **Figura 22** se muestran los shRNAs que lograron abatir efectivamente los niveles de mRNA de $Na_v1.6$ y el porcentaje de disminución en la abundancia relativa que cada uno produjo en comparación con la secuencia control (16S), la cual carecía de un blanco molecular en la célula. Los resultados de la **Figura 22** indican que la construcción que codifica para el shRNA 16H produjo la mayor disminución de los niveles del mRNA del canal $Na_v1.6$, por lo que los oligonucleótidos 16H y 16S fueron utilizados para construir lentivirus (ver Materiales y Métodos).

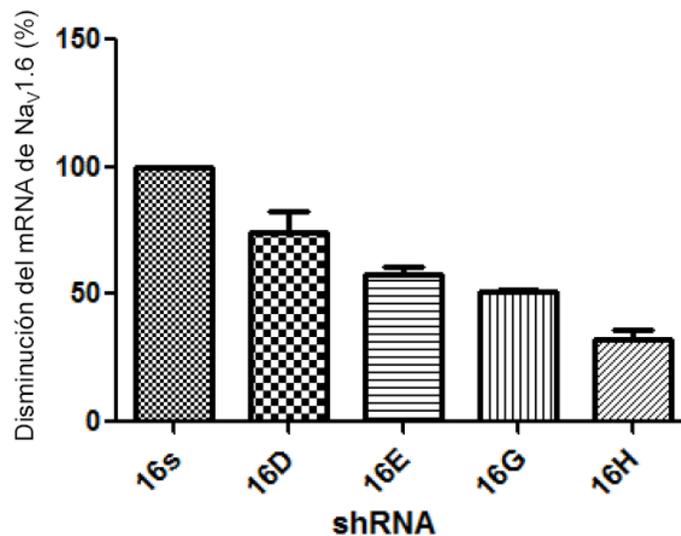


Figura 22. Efecto de shRNAs sobre la abundancia relativa del mRNA de $Na_v1.6$. La abundancia relativa del mRNA de $Na_v1.6$ en células HEK-293-FT transfectadas con las construcciones de shRNAs indicadas fue determinada por qPCR después de 48 h de incubación. El porcentaje de abatimiento en los niveles de $Na_v1.6$ que cada shRNA produjo fue normalizado con respecto al control 16S, empleando a GAPDH como gen normalizador ($n \geq 3$).

Transducción de células de CaCu con lentivirus

Los lentivirus generados se utilizaron para infectar primeramente células HeLa. La eficiencia de la transducción se evaluó mediante la inducción de la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP), contenida en las construcciones Krab16H y Krab16S, promovida por la adición de doxiciclina (Dox) al medio de cultivo en el que fueron incubadas las células (**Figura 23**). Como se puede observar en las microfotografías obtenidas bajo condiciones de fluorescencia, prácticamente el 100% de las células HeLa fueron transducidas con los plásmidos en cuestión; adicionalmente se comprobó que la inducción con doxiciclina fue efectiva, ya que no hubo expresión de GFP en las células cuyo cultivo no fue expuesto al antibiótico. Con la caracterización anterior se procedió a establecer dos tipos de líneas celulares: inducidas con doxiciclina y no inducidas. Ambos tipos celulares fueron propagados y congelados en nitrógeno líquido con medio de congelación para usos posteriores.

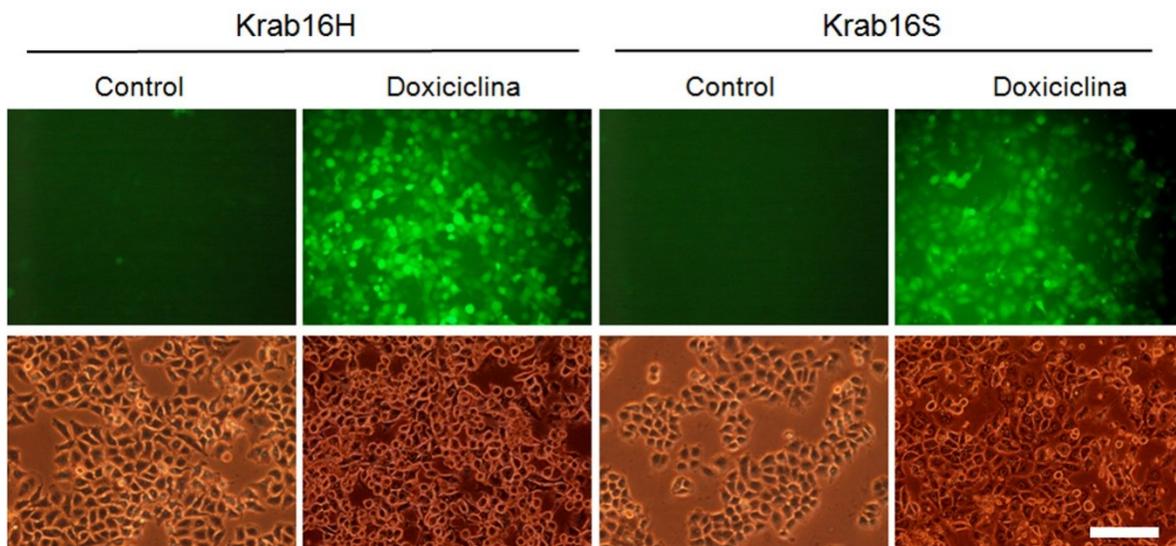


Figura 23. Transducción de células HeLa con lentivirus 16H y 16S. Células HeLa infectadas con los lentivirus 16H (izquierda) y 16S (derecha). Después de 72 h de la infección con el respectivo lentivirus, la expresión de éste se indujo mediante la adición de doxiciclina (2 μ l, 20 ng/ μ l) al medio de cultivo. Un grupo de células permaneció como Control sin la adición de doxiciclina. Las fotos se adquirieron 72 h después del estímulo con el antibiótico. Los paneles de la parte superior corresponden a las imágenes bajo condiciones de fluorescencia de los mismos campos ilustrados en la parte inferior en contraste de fases. La barra blanca en la imagen inferior de la extrema derecha representa 100 μ m y es válida para todas las imágenes.

Los lentivirus probados en células HeLa fueron empleados bajo las mismas condiciones experimentales para infectar células del cultivo CaCu 354 para inducir el abatimiento del mRNA de $\text{Na}_v1.6$. Después de cinco días de haber sido infectadas, las células CaCu 354 fueron propagadas para posteriormente ser divididas en dos grupos: a) Control, sin inducción, y b) inducido con Dox, para permitir la expresión del shRNA, lo cual fue comprobado mediante la observación de la expresión de la proteína GFP (**Figura 24B**). Posteriormente, una alícuota de ~10% de cada grupo de células fue sembrada en fragmentos de cubreobjetos para registro electrofisiológico con la técnica de *patch clamp*, mediante las condiciones descritas previamente; el resto de las células fue lisado para extraer RNA total con el reactivo de trizol. En las células en las que se indujo la expresión del shRNA con Dox se observó una reducción de aproximadamente el 30% en la amplitud de la corriente de sodio registrada al pico de la curva *I-V* (0 mV; **Figura 24C y D**). El valor de densidad de corriente fue de -23 ± 3 pA/pF ($n = 6$) y -16 ± 2 pA/pF ($n = 8$) en las células control y tratadas con Dox, respectivamente (**Figura 24D**). Los resultados anteriores se obtuvieron de células tratadas durante 36 h con Dox, y como se puede apreciar en la curva *I-V*, la disminución en la amplitud de la corriente de sodio causada por el shRNA no se acompañó de cambios aparentes en la dependencia al voltaje de la activación de la corriente, lo cual es consistente con un efecto exclusivo sobre la cantidad de canales presentes en la membrana plasmática de las células de CaCu 354.

Los resultados de la presente sección muestran que el uso de lentivirus para abatir la expresión del mensajero del canal $\text{Na}_v1.6$ en las células de CaCu representa una estrategia experimental para disminuir la contribución de este canal a la corriente de sodio total de dichas células.

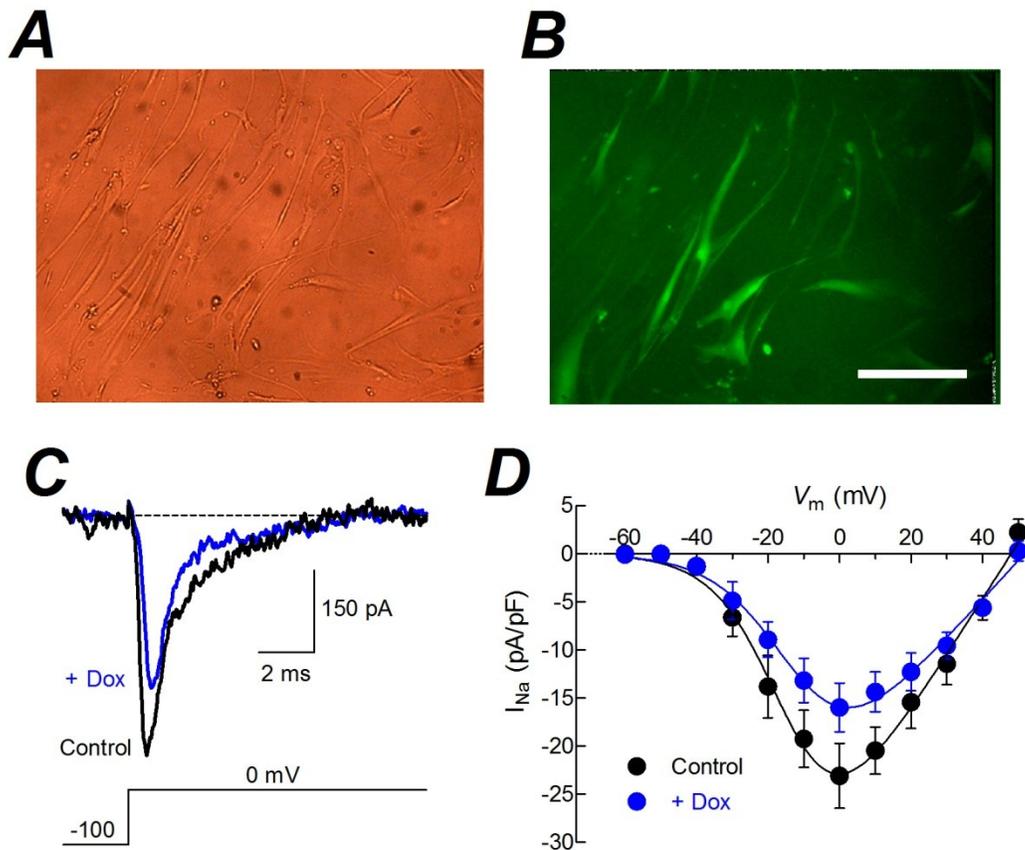


Figura 24. Disminución de la corriente generada por los canales Na_v1.6 en células de CaCu mediante la acción de un shRNA. Fotografía con microscopía de campo claro (A) y en condiciones de fluorescencia (B) de cultivos de células 354-16H tratadas con Dox (2 μ l, 20 ng/ml) por 24 h. La eficiencia de la transducción se demuestra por el porcentaje de células que expresan la GFP en condiciones de fluorescencia, el cual fue de \sim 70% en los cultivos estudiados. Después de un promedio de 36 h en cultivo las células se estudiaron con la técnica de *patch clamp* y se obtuvieron registros de la corriente de sodio total en ambos cultivos: no inducidos e inducidos con Dox (C), a partir de los cuales se construyeron curvas *I-V* para ambas condiciones (D). Las líneas continuas representan el ajuste de los datos experimentales con la Ecuación 1 (ver Materiales y Métodos).

Expresión de canales Na_v exógenos en líneas celulares de CaCu

Como un objetivo adicional del presente trabajo de tesis doctoral, y con el propósito de obtener un modelo celular para estudiar el papel de los canales de sodio en la biología del CaCu, así como los posibles mecanismos moleculares por los que los canales Na_v contribuyen a la invasividad celular, se estudió la expresión de canales Na_v exógenos en células HeLa. Resultados recientes de nuestro laboratorio demostraron que las líneas celulares de CaCu: Caski y Siha

(positivas a VPH-16), así como CaLo, HeLa e INBL (positivas a VPH-18) no expresan corrientes de sodio activadas por voltaje endógenas, observación que fue apoyada por los escasos niveles de mRNA de las diferentes subunidades α de los canales Na_v . Sorprendentemente, las subunidades β presentaron una expresión moderada en todas las líneas celulares estudiadas (Sánchez-Sandoval, 2011). Por lo anterior, se utilizaron las células HeLa como un posible modelo de expresión de canales Na_v para posteriormente estudiar los aspectos relacionados con la biología del CaCu.

Para evaluar la capacidad de las células HeLa de expresar funcionalmente canales Na_v , se transfectó el DNA de las subunidades $\text{Na}_v1.5$, $\text{Na}_v1.6$ o $\text{Na}_v1.7$ mediante transfección transitoria y se realizaron registros electrofisiológicos con la técnica de *patch clamp* en la configuración de célula completa. Paralelamente, se realizaron las mismas transfecciones en células HEK-293 las cuales sirvieron como referencia (Wehrens *et al.*, 2002; Chatelier *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2011) para realizar la caracterización de las corrientes expresadas en las células HeLa. Debido a que la amplitud de las corrientes generadas por los canales Na_v transfectados fue excesivamente grande (mayores a 10 nA) sobre todo para el canal $\text{Na}_v1.5$, en esta serie de experimentos se utilizó la solución externa baja en sodio (ver Métodos). Bajo estas condiciones experimentales se logró obtener registros de corriente de sodio generados por los canales $\text{Na}_v1.5$ (**Figura 25**), $\text{Na}_v1.6$ (**Figura 26**), y $\text{Na}_v1.7$ (**Figura 27**), tanto de células HeLa como de HEK-293, con características biofísicas muy semejantes, aunque también se observaron diferencias apreciables, principalmente en la amplitud de las corrientes y en menor medida, en la cinética de inactivación.

La amplitud de las corrientes de sodio registradas en células HeLa transfectadas con el canal $\text{Na}_v1.5$ fue mayor que la registrada bajo las mismas condiciones en células HEK-293 (**Figura 25A y B**); no obstante, debido a que el tamaño (capacitancia membranal) de las células HeLa es casi 3 veces más grande que el de las HEK-293 (21.8 ± 1.9 pF y 8.2 ± 1.3 pF, respectivamente), la cantidad de corriente por unidad de membrana fue mayor en esta últimas -142.3 ± 9.7 pA/pF ($n = 3$) contra -31.1 ± 3.8 pA/pF ($n = 5$) en las primeras. Además, la corriente máxima se registró a

-20 mV en las células de CaCu, mientras que en las células HEK-293 ésta apareció a -30 mV (Figura 25C). En este caso, no hubo diferencias aparentes en la cinética de las corrientes generadas por ambos tipos celulares.

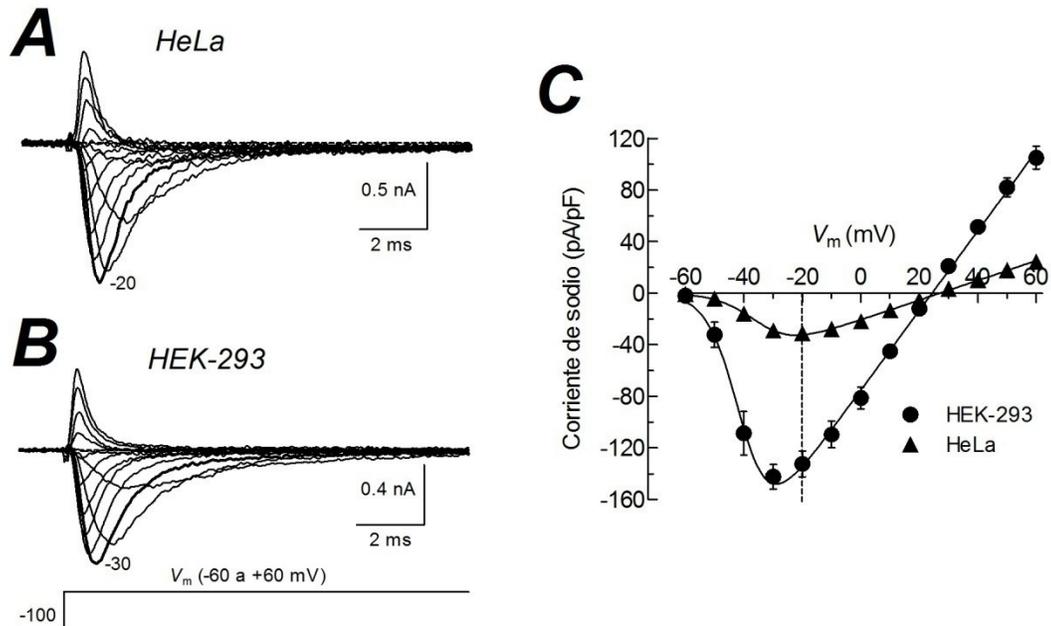


Figura 25. Corrientes de sodio generadas por el canal Na_v1.5 transfectado en células HeLa y HEK-293. Trazos representativos de corrientes de sodio registradas a diferentes valores de V_m de una célula HeLa (A) y una HEK-293 (B). Las corrientes fueron evocadas por pulsos despolarizantes de 16 ms de duración a voltajes entre -60 y +60 mV en incrementos de 10 mV, a partir de un potencial de mantenimiento de -100 mV. El trazo remarcado indica la corriente máxima registrada en cada uno de los tipos celulares. (C) Relaciones I-V de la corriente del canal Na_v1.5. A partir de registros como los mostrados en A y B se graficó la amplitud máxima registrada a cada voltaje explorado (media ± EE) de células HeLa (n = 5) y HEK-293 (n = 3). Nótese que las células HeLa expresaron 4 veces menos corriente por unidad de membrana que las células HEK-293. Además en las primeras el pico de la curva I-V se alcanzó a -20 mV, mientras que en las segundas esto sucedió a -30 mV. Los datos experimentales fueron ajustados con la Ecuación 1 (líneas continuas; ver Materiales y Métodos).

Además de la activación dependiente de voltaje de la corriente generada por los canales Na_v1.5, también se investigó el proceso de inactivación de dichos canales cuando se expresaron en células HeLa y HEK-293. En primer lugar, la inactivación en el estado estacionario se estudió con un protocolo clásico de dos pulsos, uno para inactivar a los canales a diferentes valores de V_m y

otro para evaluar la fracción de canales disponibles para ser activados a -30 mV (ver protocolo **Figura 26B**). Los resultados de la aplicación de estos protocolos en células HeLa y HEK-293 transfectadas con el canal $\text{Na}_v1.5$ se resumen en la **Figura 26**. A juzgar por la amplitud de las corrientes registradas a -30 mV después del prepulso a -90 mV durante 200 ms, se infiere que la inactivación dependiente de voltaje del canal de sodio es similar en ambos tipos celulares (**Figura 26A y B**). Esta observación se confirmó al normalizar la amplitud de las corrientes registradas a -30 mV, cuyos valores fueron promediados entre el mismo grupo de células y graficados en función del voltaje del prepulso (**Figura 26C**). Los datos experimentales se ajustaron con funciones Boltzmann y los parámetros obtenidos indicaron que el voltaje al cual se inactivan el 50% de los canales $\text{Na}_v1.5$ es prácticamente el mismo en las células HeLa que en las HEK-293 (-87.4 ± 0.8 y -89.6 ± 0.3 mV, respectivamente).

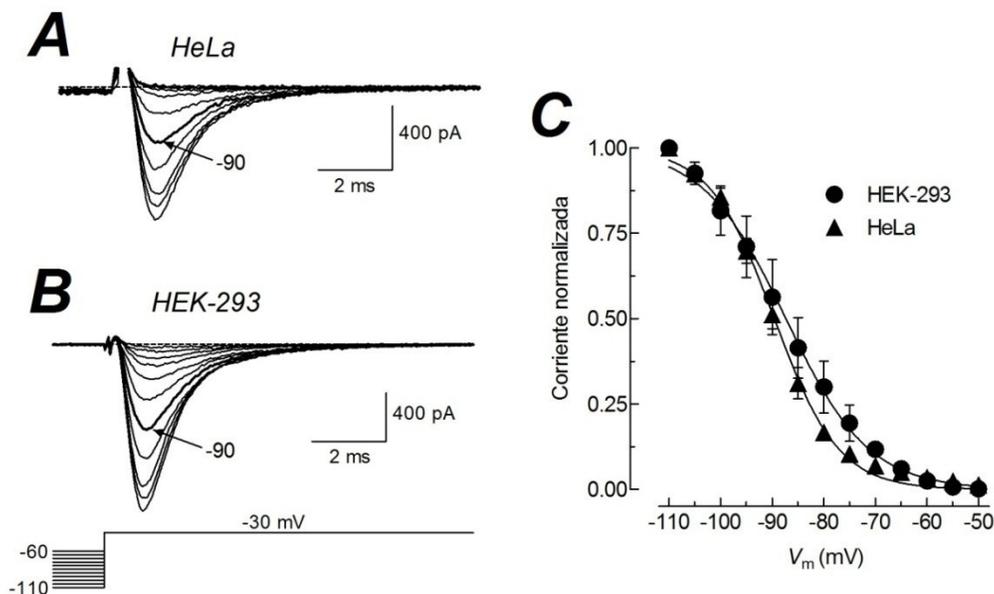


Figura 26. Inactivación en el estado estacionario de canales $\text{Na}_v1.5$ en células HeLa y HEK-293. Trazos representativos de la corriente de sodio evocada a -30 mV, después de prepulsos de 200 ms de duración a diferentes potenciales entre -110 y -50 mV (como se indica en el protocolo de voltaje al pie del panel **B**) obtenidos de una célula HeLa (**A**) y una HEK-293 (**B**) transfectadas con el canal $\text{Na}_v1.5$. Con fines comparativos se señalan los trazos de corriente obtenidos después de la despolarización por 200 ms a -90 mV, en donde se puede apreciar que la magnitud de la corriente fue prácticamente la misma en ambos tipos celulares. **C**) Curvas de inactivación en el estado estacionario del canal $\text{Na}_v1.5$. Los puntos experimentales se obtuvieron normalizando la amplitud de la corriente registrada a -30 mV y se grafican en función del voltaje del prepulso. Cada grupo de datos fue ajustado con una función Boltzmann (líneas continuas). Mismas células que en la Figura 25.

El segundo aspecto de la inactivación de los canales $\text{Na}_v1.5$ que se exploró en el presente estudio fue el curso temporal con el que los canales se recuperan de la inactivación. Utilizando el protocolo de voltaje ilustrado en la **Figura 27B**, se obtuvieron registros de corriente de sodio de células HeLa (**Figura 27A**) y HEK-293 (**Figura 27B**) transfectadas con el canal $\text{Na}_v1.5$. Analizando la amplitud de los registros en ambas células se observa que después de 120 ms a -100 mV prácticamente el 100% de los canales se encuentran disponibles para ser activados nuevamente, aunque esto sucedió más rápidamente cuando el canal se expresó en células HeLa (**Figura 27C**). La constante de tiempo de recuperación de la inactivación (τ_h) fue de 31 ± 1 ms para HeLa y 44 ± 1 ms para HEK-293 ($n = 3$ en ambos casos).

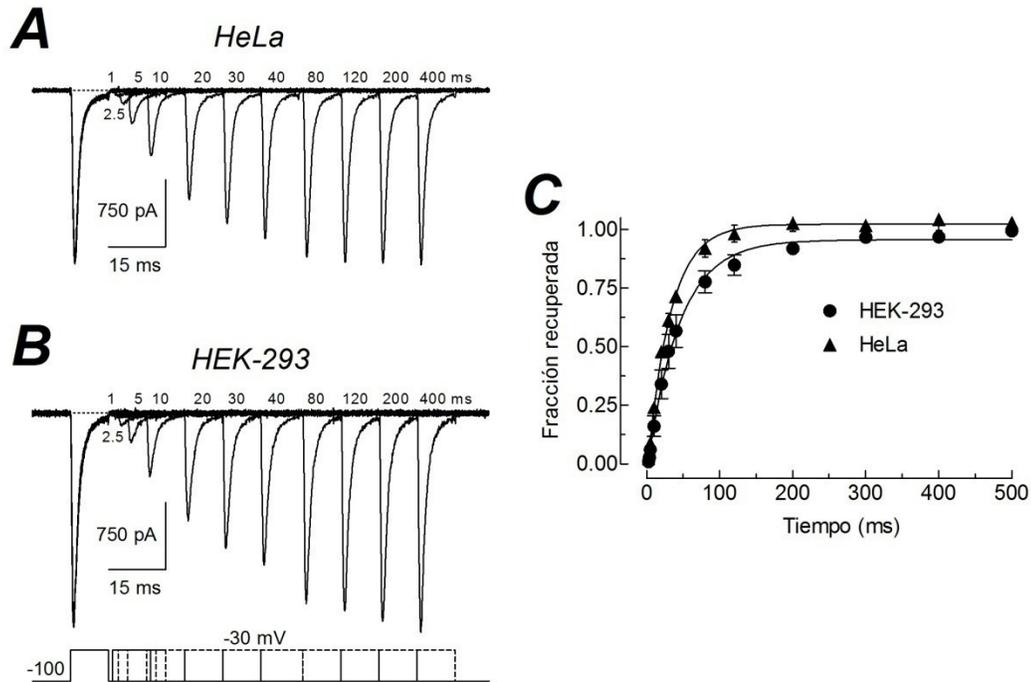


Figura 27. Recuperación de la inactivación de los canales $\text{Na}_v1.5$. Trazos representativos de la recuperación de la inactivación de los canales $\text{Na}_v1.5$ en células HeLa (**A**) y HEK-293 (**B**). Los canales de sodio fueron activados e inactivados con un prepulso de 10 ms a -30 mV (a partir de un potencial de mantenimiento de -100 mV), seguido de un periodo de recuperación a -100 mV por periodos de 1 a 500 ms, para posteriormente evaluar la recuperación de la corriente con un pulso de prueba a -30 mV nuevamente. El protocolo de voltaje se esquematiza en (**B**). **C**) Fracción de corriente de sodio recuperada en función del tiempo. La amplitud de la corriente de cada uno de los pulsos de prueba se normalizó respecto a la del prepulso en ambos tipos celulares. Los datos fueron ajustados con una función exponencial con las siguientes constantes de tiempo (τ_h): 31 ± 1 ms para HeLa y 44 ± 1 ms para HEK-293 ($n = 3$ para cada tipo celular).

Utilizando los mismos protocolos de voltaje descritos para el canal $\text{Na}_v1.5$, también se estudio la corriente de sodio generada por la transfección de células HeLa y HEK-293 con los canales $\text{Na}_v1.6$ y $\text{Na}_v1.7$. Las características más sustanciales de estos canales, así como las diferencias en expresión en ambos tipos celulares se resumen en la **Figura 28**. El canal $\text{Na}_v1.6$ generó corrientes significativamente más grandes en las células HEK-293, aunque el curso temporal de inactivación durante el pulso a -10 mV fue similar en ambos tipos celulares (**Figura 28A**). Por su parte, la expresión del canal $\text{Na}_v1.7$ generó corrientes de magnitud muy semejante en las células HeLa y las HEK-293; sin embargo, la inactivación fue un proceso mucho más lento en las células HeLa que en estas últimas (**Figura 28B**).

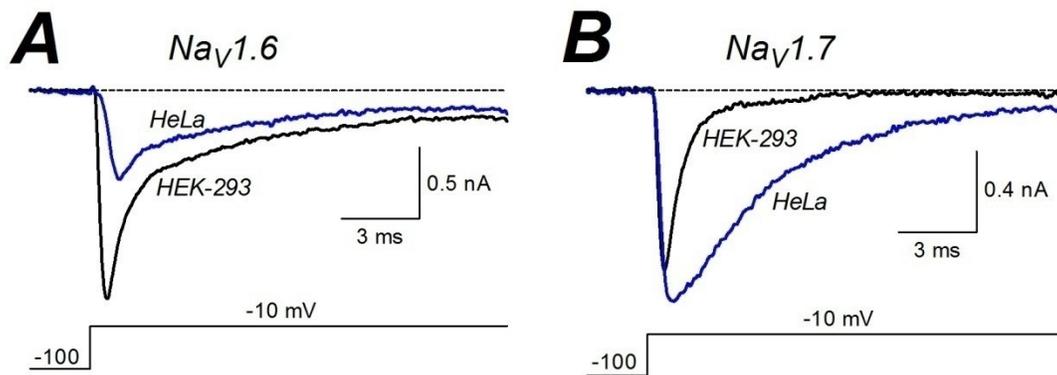


Figura 28. Corrientes de sodio de los canales $\text{Na}_v1.6$ y $\text{Na}_v1.7$ en células HeLa y HEK-293. **A)** Trazos representativos de corrientes de sodio registradas a -10 mV generadas por los canales $\text{Na}_v1.6$ (**A**) y $\text{Na}_v1.7$ (**B**) en células HeLa (trazos en azul) y HEK-293 (trazos en negro). Nótese las diferencias en amplitud y cinética de las corrientes expresadas por ambos tipos celulares. El canal $\text{Na}_v1.6$ generó corrientes significativamente más grandes en las células HEK-293, pero el curso temporal de inactivación fue muy parecida. Por su parte, el canal $\text{Na}_v1.7$ fue eficientemente expresado por ambos tipos celulares, aunque de manera clara presentó una inactivación mucho más lenta en las células HeLa.

Esta última serie de experimentos demuestran que las células HeLa son capaces de expresar en la membrana plasmática canales Na_v funcionales, por lo que, además de funcionar como un sistema de expresión heteróloga para el estudio de la biofísica de estos canales, representan un modelo para estudiar la participación de los canales Na_v en los procesos celulares del cáncer

cervicouterino, concretamente migración e invasividad, así como los mecanismos que rigen dichos procesos, reportados en la primera parte de el presente trabajo de tesis. Debido a la dificultad que representa trabajar con biopsias (disponibilidad y dificultad para generar cultivos celulares, por ejemplo), el empleo de una línea celular de CaCu en la que se puedan expresar canales de sodio exógenos para estudiar su relevancia en la biología del CaCu representa una herramienta experimental con un enorme potencial.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo demostraron que las células de CaCu (provenientes de cultivos primarios o directamente de biopsias), expresan canales de sodio activados por voltaje. Además, las células de CaCu presentaron niveles de mRNA del gen *SCN8A* (canal $Na_v1.6$) que sobrepasan en más de 40 veces los niveles detectados en el tejido no canceroso de cérvix uterino (CNC). La sobre expresión específica del mensajero del canal $Na_v1.6$ en el CaCu, además de representar un potencial marcador molecular para la detección certera de este carcinoma, resultó ser de relevancia para la progresión del CaCu, ya que el bloqueo de la actividad del canal $Na_v1.6$ repercutió en una disminución significativa de la capacidad invasiva de las células cancerosas. Por otro lado, con el propósito de desarrollar una estrategia con potencial terapéutico con fundamento en la participación de los canales $Na_v1.6$ en la biología del CaCu, se diseñaron shRNAs para abatir la expresión del canal $Na_v1.6$. La transducción de células de CaCu con lentivirus que contienen dichos shRNAs produjo una disminución sustancial de la corriente de sodio total expresada por las células infectadas. Finalmente, debido a la necesidad de contar con un sistema biológico cuya disponibilidad no sea un inconveniente, en la parte final de la presente disertación se demostró que las células HeLa (línea celular comercial de CaCu) son capaces de expresar corrientes de sodio activadas por voltaje después de ser transfectadas con canales Na_v exógenos, lo cual sugiere que estas células podrían representar un sistema heterólogo útil para estudiar diferentes aspectos de la participación de los canales Na_v en la biología del CaCu. A continuación se discuten la relevancia e implicaciones de estos resultados.

Participación de los canales Na_v en el CaCu

La primera aportación original del presente estudio radica en la demostración de que el mRNA del gen *SCN8A*, que codifica para el canal $Na_v1.6$, es sobre expresado de manera específica y significativa en biopsias y cultivos primarios de CaCu. La expresión del mensajero se reflejó en la identificación de la funcionalidad del canal $Na_v1.6$ mediante experimentos de *patch clamp* en las células de CaCu. En concreto, la subunidad $Na_v1.6$ contribuye con aproximadamente un tercio de la corriente total de sodio registrada en estas células. El bloqueo específico de los

canales $\text{Na}_v1.6$ redujo de manera significativa la invasividad *in vitro* de estas células. La implicación de tales resultados ubica a los canales $\text{Na}_v1.6$ como un posible marcador molecular del CaCu; así como un potencial blanco para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

Los resultados de qPCR mostraron que los niveles de mRNA de $\text{Na}_v1.6$ son ~40 veces mayores en las muestras de CaCu comparados con las muestras de CNC (**Figura 12B**). Interesantemente, la subunidad $\text{Na}_v1.6$ presentó los niveles de mRNA más bajos en las muestras de CNC, junto con la subunidad $\text{Na}_v1.1$ (**Figura 12A**); sin embargo, solamente $\text{Na}_v1.6$ presentó una regulación positiva claramente distinguible en las muestras de CaCu (**Figura 12B**). Por el contrario, los niveles de mRNA de $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$ y $\text{Na}_v1.7$ fueron expresadas moderadamente en las muestras de CNC, pero no mostraron cambios significativos al ser comparadas con las muestras de CaCu (**Figura 13**).

Notablemente, la secuencia de la subunidad $\text{Na}_v1.6$ identificada en el presente estudio corresponde a la isoforma Q9UQD0-2, la cual es una de las más abundantes en neuronas del sistema nervioso central (Plummer *et al.*, 1997). La secuenciación de los amplicones de $\text{Na}_v1.6$ indicaron que los transcritos presentes en las células de cérvix uterino contienen el exón 5A, y no el 5N, como ha sido reportado para $\text{Na}_v1.1$ y $\text{Na}_v1.3$, que experimentan cambios en su expresión a través del desarrollo (Sarao *et al.*, 1991; Gustafson *et al.*, 1993). En este contexto, la isoforma neonatal del canal $\text{Na}_v1.5$ es abundantemente expresada en las células altamente metastásicas de cáncer de mama (Fraser *et al.*, 2005; Brackenbury *et al.*, 2007), pulmón (Roger *et al.*, 2007) y ovario (Gao *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha mostrado que la isoforma 5A (variante adulta) de $\text{Na}_v1.6$ es expresada tanto en el cerebro adulto como en el fetal (Raymond *et al.*, 2004; Gazina *et al.*, 2010). Es importante hacer notar que $\text{Na}_v1.1$ - $\text{Na}_v1.3$ y $\text{Na}_v1.7$ se localizan en la región cromosómica 2q23-24, mientras que $\text{Na}_v1.6$ se encuentra en el cromosoma 12 (12q13); por lo tanto, es factible pensar que la inestabilidad cromosómica observada en las células cancerosas puede influenciar el perfil de transcripción en el CaCu, como se ha observado en la línea celular DU145 de cáncer de próstata (Chaudhary & Schmidt, 2006).

Previamente ha sido demostrado por otros grupos de investigación que los canales Na_v se encuentran sobre expresados en varios tipos de células cancerosas, incluyendo mama, colon, pulmón y ovario, y que su funcionamiento contribuye de manera relevante en procesos celulares ligados a la invasión, secreción, adhesión y movilidad (Roger *et al.*, 2007; Ding *et al.*, 2008; Chioni *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2010; House *et al.*, 2010). Interesantemente, el mensajero del canal $\text{Na}_v1.5$ se encuentra regulado a la alta en varios tipos celulares cancerosos, exceptuando al cáncer de próstata, donde $\text{Na}_v1.7$ es la subunidad mayormente expresada; sin embargo, en el CaCu la actividad funcional de $\text{Na}_v1.5$ parece ser casi nula, ya que el 97% de la corriente de sodio es bloqueada con 1-2 μM de TTX en células derivadas de cultivos primarios de este tipo de cáncer (Diaz *et al.*, 2007; véase también **Figura 19A** de la presente disertación), lo que confirma la participación únicamente de canales de sodio sensibles a la TTX ($\text{Na}_v1.5$ se encuentra dentro del grupo de canales Na_v resistentes a dicha toxina). Aunado a ello, los resultados de qPCR demostraron que la isoforma neonatal del mRNA de $\text{Na}_v1.5$ se encuentra significativamente menos expresada que la isoforma adulta, y ambas presentan niveles de expresión más bajos en muestras de CaCu comparados con biopsias de CNC (**Figura 15**). Asimismo los experimentos de inmunohistoquímica confirmaron la ausencia de la proteína de $\text{Na}_v1.5$ en biopsias de CaCu (**Figura 15C**). Estas evidencias sugieren fuertemente que el papel de $\text{Na}_v1.5$ no tiene la misma relevancia en el CaCu que en otros tipos de cáncer.

Por el contrario, con el presente estudio se demuestra que la proteína del canal $\text{Na}_v1.6$ es sustancialmente expresada en la membrana plasmática, así como en compartimentos intracelulares de células derivadas de cultivos primarios y biopsias frescas de CaCu (**Figura 18**). Además, el funcionamiento de la proteína del canal $\text{Na}_v1.6$ contribuye aproximadamente a un tercio del total de la corriente de sodio registrada en células de CaCu (**Figura 19**). Es muy probable que los dos tercios remanentes de la corriente de sodio sean transportados por otros canales Na_v sensibles a la TTX, cuyo mRNA fue detectado en las mismas células ($\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$ y $\text{Na}_v1.7$). Así, los resultados de qPCR que muestran un incremento en los niveles de mRNA de $\text{Na}_v1.6$ son consistentes con la expresión y funcionalidad del canal, observadas con ensayos de inmunohistoquímica y *patch clamp*. Los estudios inmunohistoquímicos proporcionaron otro

resultado interesante. Los cortes de biopsias de CaCu mostraron que las proteínas de los canales $\text{Na}_v1.6$ y $\text{Na}_v1.7$ se encuentran ampliamente distribuidas en membranas tanto citoplasmática como de compartimentos intracelulares de las muestras de CaCu; por el contrario, en las muestras de CNC la señal de las proteínas se encontró limitada a la membrana plasmática (**Figura 18A**).

La expresión intracelular de $\text{Na}_v1.6$ ha sido observada en macrófagos humanos, donde se localiza en vesículas que se distribuyen en el citoplasma y algunas se encuentran asociadas al citoesqueleto de actina (Carrithers *et al.*, 2007), participando en el control de la formación de podosomas e invadopodios, sugiriendo con ello su participación en la invasividad celular de los macrófagos (Carrithers *et al.*, 2009). Interesantemente, se encontró que los niveles del mRNA de β -actina se encuentran incrementados alrededor de mil veces en las muestras de CaCu (Hernández Plata, 2008). Los cambios en la distribución celular de los canales $\text{Na}_v1.6$ se encuentran mejor ejemplificados en pacientes con esclerosis múltiple donde el canal es expresado a lo largo de axones desmielinizados y degenerados, en lugar de estar confinados a su localización normal en los nodos de Ranvier (Craner *et al.*, 2004b). El mismo grupo de investigación reportó la colocalización de canales $\text{Na}_v1.6$ y el intercambiador sodio-calcio (NCX) en sitios de daño axonal y médula espinal en encefalomiелitis alérgica experimental (Craner *et al.*, 2004a). Esta colocalización podría ser relevante para los mecanismos que involucran a los canales $\text{Na}_v1.6$ en el comportamiento metastásico de las células de CaCu, mismos que requieren de estudios posteriores para ser dilucidados en su totalidad.

Además de su posible papel a nivel intracelular, los canales $\text{Na}_v1.6$ localizados en la membrana plasmática de las células de CaCu participan activamente en el comportamiento metastásico de este carcinoma. El bloqueo de un tercio del total de la corriente de sodio en las células derivadas de cultivos primarios de CaCu (**Figura 19**), así como la disminución de la invasividad relativa (**Figura 21B**) por la acción de la toxina Cn2 (específica para $\text{Na}_v1.6$) implica la participación directa de la corriente iónica transportada por la subunidad $\text{Na}_v1.6$ presente en la membrana plasmática de las células de CaCu. La contribución de los restantes canales Na_v

identificados en el CaCu ($\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$ y $\text{Na}_v1.7$) al comportamiento metastásico parece ser menos significativo, prácticamente nulo, ya que el efecto de la TTX en la invasividad fue estadísticamente el mismo que el observado con la toxina Cn2 (**Figura 21B**), sugiriendo que el canal $\text{Na}_v1.6$ es el único que participa en el proceso de invasividad de las células de CaCu. Previamente, se ha observado una correlación positiva entre la densidad de la corriente de sodio y la invasividad relativa en el cáncer de mama y próstata, donde las líneas celulares altamente metastásicas expresan corrientes de sodio (Grimes *et al.*, 1995; Laniado *et al.*, 1997; Fraser *et al.*, 2005). Sin embargo, los resultados observados en las células de CaCu no fueron dependientes de la densidad de corriente, ya que los dos tipos de células de CaCu estudiados, 085 y 354, fueron igualmente afectados en su comportamiento invasivo *in vitro* por las toxinas TTX y Cn2, a pesar de que las primeras expresan casi el doble de corriente por unidad de área de membrana que las segundas (Diaz *et al.*, 2007). Con estos resultados se mostró por primera vez la relación entre la actividad de los canales de sodio y el comportamiento metastásico en cultivos primarios derivados de un carcinoma primario, sugiriendo que los canales $\text{Na}_v1.6$ tienen una participación funcional relevante en la progresión del CaCu.

En la actualidad, no hay un mecanismo aceptado universalmente para explicar el papel de los canales Na_v en el comportamiento metastásico de algunas células cancerosas, aunque al menos dos posibles escenarios deben considerarse: el influjo del ión Na^+ a través de las subunidades alfa de los canales Na_v y el papel de las subunidades beta de estos mismos canales como moléculas de adhesión. El primero incluye observaciones referentes a un influjo tónico de Na^+ a través de las subunidades alfa (Roger *et al.*, 2003), cuya inhibición con TTX redundaría en la disminución de varios comportamientos celulares asociados a la metástasis (Brackenbury *et al.*, 2008), o incrementando la invasividad a través de un aumento en las concentraciones de Na^+ mediante el uso de agonistas de los canales Na_v como la veratridina (Gillet *et al.*, 2009). No obstante, la mayor crítica a la hipótesis del influjo de Na^+ es que la corriente transitoria a través de los canales Na_v podría no tener efectos significativos en la concentración intracelular de sodio en estas células, por lo que sería poco probable que este efecto active vías de señalización río abajo. No obstante, la generación de gradientes locales de Na^+ no debe ser descartado

(Nikolaeva *et al.*, 2005; Bennay *et al.*, 2008). Además, la participación ya mencionada del cotransportador NCX en modo inverso (extrusión de Na^+ /introducción de Ca^{2+}) que se observa cuando la concentración intracelular de Na^+ es elevada (Piacentino, III *et al.*, 2002; Weisser-Thomas *et al.*, 2003) y en los mecanismos iónicos del daño anóxico en los axones de mamíferos (Stys *et al.*, 1992; Waxman *et al.*, 1992), con los bien caracterizados efectos del Ca^{2+} , es congruente con la colocalización específica del canal $\text{Na}_v1.6$ y el cotransportador NCX observado en el daño axonal experimental (Craner *et al.*, 2004a).

Alternativamente, la contribución de los canales Na_v en la metástasis podría ser debida a una función no conductora por medio de interacciones directas de las subunidades beta de los canales Na_v con otras proteínas de membrana y/o intracelulares (Diss *et al.*, 2004; Diss *et al.*, 2008). Por ejemplo, las subunidades $\text{Na}_v\beta1$ y $\text{Na}_v\beta2$ pueden asociarse con las tenasinas C y R, influenciando de este modo la migración celular y participando en la adhesión celular homofílica, que resulta en la agregación celular y el reclutamiento de anquirina (Brackenbury *et al.*, 2008).

Importantemente, las subunidades $\text{Na}_v\beta1$, $\text{Na}_v\beta2$ y $\text{Na}_v\beta4$ son expresadas en líneas celulares de cáncer de mama, donde los niveles de mRNA y proteína de $\text{Na}_v\beta1$ son significativamente mayores en la línea celular débilmente metastásica MCF-7, comparada con las células altamente metastásicas MDA-MB-231, hecho que es consistente con una mayor adhesividad de las células MCF-7. Además, la sobreexpresión estable de $\text{Na}_v\beta1$ en las células MDA-MB-231 incrementó la actividad de los canales Na_v y la adhesión celular, lo que redujo la movilidad celular, sugiriendo que los efectos de $\text{Na}_v\beta1$ sobre la adhesión de la célula puede ser independiente de sus conocidos efectos sobre la excitabilidad celular (Chioni *et al.*, 2009). Finalmente, una función recíproca entre $\text{Na}_v\beta1$ y $\text{Na}_v1.6$ fue recientemente reportada en las neuronas granulares del cerebelo, donde la extensión neural mediada por $\text{Na}_v\beta1$ requiere del influjo de Na^+ mediado por $\text{Na}_v1.6$, mientras que la localización de $\text{Na}_v1.6$ y la alta frecuencia de disparo requieren de la presencia de $\text{Na}_v\beta1$ (Brackenbury *et al.*, 2010). En el presente estudio se observó que el bloqueo directo de las subunidades alfa de los canales Na_v reduce la invasividad de las células de los

cultivos primarios de CaCu; sin embargo, aún queda por determinar si las subunidades beta tienen una contribución adicional en el comportamiento metastásico de estas células. Adicionalmente, los niveles contrastantes de mRNA de las subunidades $\text{Na}_v\beta 2$ y $\text{Na}_v\beta 4$ expresados en las células de los cultivos primarios y las biopsias de CaCu (**Figura 17**) puede implicar nuevas funciones para estas subunidades en las propiedades celulares relacionadas al mantenimiento y progresión tumoral.

En conclusión, la sobre expresión funcional de los canales $\text{Na}_v 1.6$ en el CaCu representa un novedoso potencial marcador molecular para la detección del CaCu, así como un blanco para nuevas estrategias terapéuticas de este carcinoma.

Uso de RNA de interferencia para estudiar la participación de canales Na_v en el CaCu

El descubrimiento de la regulación de la expresión génica a través de RNAs interferentes (iRNAs), mediante un mecanismo celular endógeno, ha abierto la posibilidad de diseccionar la función de prácticamente cualquier gen en las vías de señalización en las que participa (Dykxhoorn *et al.*, 2003; Hannon & Rossi, 2004). La habilidad de manipular a los iRNAs en células de mamífero provee por lo tanto una herramienta poderosa para modular la expresión génica.

Con fundamento en la disminución de la capacidad invasiva de las células de CaCu observada mediante el uso de la toxina Cn2, específica para el bloqueo de la actividad del canal $\text{Na}_v 1.6$, surgió el interés de desarrollar un shRNA que permitiera continuar con la caracterización del papel de dicho canal en la biología del CaCu, así como el obtener una herramienta experimental con potencial terapéutico para el CaCu. El shRNA 16H generado como parte de los objetivos de la presente tesis permitió eliminar ~35% de la corriente máxima de sodio presente en las células CaCu354 (**Figura 24**), esta observación es consistente con lo observado en los ensayos funcionales realizados con la toxina Cn2 (**Figura 21**); por lo que el shRNA 16H constituye una herramienta renovable que permitirá profundizar en la caracterización del papel del canal $\text{Na}_v 1.6$ en la biología del cáncer.

Los vectores lentivirales constituyen una herramienta única que permite integrar la expresión de siRNAs en el genoma celular con el objetivo de abatir persistentemente la expresión de genes específicos, con la posibilidad de discernir funciones génicas en modelos *in vivo* e incluso ser empleados para brindar terapia génica en el tratamiento de distintas patologías (Scherr *et al.*, 2003; Van den Haute *et al.*, 2003). Actualmente se cuenta con un gran número de vectores lentivirales que han sido desarrollados para direccionar la liberación y expresión de shRNAs. Algunos de ellos codifican para la proteína verde fluorescente (GFP) como marcador de infectividad y para monitorear la expresión del shRNA en tiempo real (Rubinson *et al.*, 2003). Otros vectores contienen antibióticos como marcadores de selección, tales como puromicina o zeocina que son empleados cuando el protocolo experimental demanda la selección de la población celular en donde se ha llevado a cabo correctamente la inserción del shRNA. Adicionalmente, existen versiones condicionales de vectores lentivirales que permiten encender o apagar la expresión del shRNA según se requiera en el protocolo de investigación. Los sistemas inducibles con fármacos permiten tener un control fino de la expresión y abatimiento de los genes de interés, y por ello constituyen herramientas invaluable para la investigación genética y podrían desempeñar papeles importantes en la investigación traslacional o terapia génica (Szulc & Aebischer, 2008).

La implementación clínica de la terapia génica puede requerir de la habilidad de modular la expresión del gen terapéutico para mantener los niveles de expresión dentro de una ventana terapéutica y ajustar los niveles de expresión basados en la progresión de la enfermedad del paciente. Para lograr la regulación de la expresión, se ha recurrido al uso de sistemas modulados por moléculas pequeñas; dentro de los cuales, el sistema con regulación por tetraciclina es uno de los más empleados con eficacia probada *in vitro* e *in vivo* (Toniatti *et al.*, 2004). Este sistema está basado en el operador Tn10 de resistencia a tetraciclina de *Escherichia coli*, consistente de la proteína represora de tetraciclina (TetR) y la secuencia del operador de tetraciclina (TetO), que es el sitio de unión específico a DNA. En ausencia de tetraciclina, la proteína TetR dimeriza y se une a TetO, evitando así la expresión génica. La tetraciclina o su derivado, la doxiciclina pueden unirse e inducir un cambio conformacional en la proteína TetR

llevando a su disociación de TetO, lo que activa la expresión. Una mutante de TetR (rTetR) fue identificada con un fenotipo inverso donde la unión a TetO requiere la presencia de doxiciclina. En ausencia de doxiciclina la mutante TetR no se une a TetO (Gossen *et al.*, 1995). Para usar este sistema en células de mamífero, se han hecho modificaciones al sistema bacteriano tanto a la secuencia de DNA de TetO, como a la estructura de la proteína TetR, para generar vectores cuya expresión sea apagada o encendida en presencia de doxiciclina y para aumentar la sensibilidad del sistema al fármaco (Urlinger *et al.*, 2000).

El contar con un shRNA codificado por un vector lentiviral con expresión inducible mediante el uso de doxiciclina, permite establecer las bases de una posible terapia génica del CaCu basada en el abatimiento de la expresión del canal Na_v1.6 en células cancerosas. Mucho se ha dicho en contra del uso de lentivirus para propiciar la expresión de transgenes como una alternativa terapéutica; sin embargo, el uso de lentivirus como herramienta en terapia génica ofrece múltiples ventajas, entre las que se encuentra el hecho de que no requiere de división celular para que se produzca la infección efectiva y la liberación génica que no requiere de la administración de factores de crecimiento para inducir la proliferación celular. Son lo suficientemente robustos para ofrecer un sistema de administración *in vivo*; ya que haciendo una selección minuciosa de la pseudotipificación lentiviral es posible dirigir de manera específica la transducción de las células blanco con alta eficacia y estabilidad de expresión transgénica. En definitiva, el uso de vectores lentivirales de expresión inducible provee una herramienta útil en el estudio y probable tratamiento del cáncer (Kay *et al.*, 2001).

Dentro de las perspectivas que surgen a partir del presente trabajo de tesis se encuentra la caracterización de las vías de señalización que se encuentran involucradas en el potenciamiento de la capacidad invasiva de las células de CaCu promovida por el canal Na_v1.6 que hasta el momento son desconocidas. Relevantemente, la modulación de la expresión de este canal mediante el uso de vectores lentivirales inducibles abre las puertas al desarrollo de estrategias de terapia génica contra el CaCu.

Células HeLa como sistema de expresión heteróloga de canales Na_v

Un objetivo adicional del presente trabajo de tesis consistió en investigar si las células HeLa son capaces de expresar corrientes de sodio activadas por voltaje mediante la transfección de canales Na_v exógenos. Recientemente, nuestro grupo de investigación reportó que varias líneas celulares de CaCu (HeLa, CaSki, SiHa, CaLo e INBL) no expresan corrientes de sodio sensibles al voltaje, lo cual se asoció con una pobre expresión del mensajero de las subunidades α que forman los canales Na_v; sorprendentemente todas las líneas celulares exploradas presentaron niveles moderados del mensajero de las subunidades Na_v β 1, Na_v β 2 y Na_v β 4, mientras que la subunidad Na_v β 3 exhibió los niveles de mRNA mas bajos de las cuatro subunidades (Sánchez-Sandoval, 2013). No obstante, a la fecha no se ha estudiado si las células HeLa expresan la proteína funcional de dichas subunidades β .

Tales resultados plantean una aparente discordancia con nuestro reporte original sobre la expresión de canales de sodio funcionales en cultivos primarios derivados de biopsias de CaCu (Diaz *et al.*, 2007) y los del presente trabajo de tesis (**Figuras 12, 18 y 19**) en las que se muestran evidencias contundentes sobre la expresión funcional de los canales Na_v en células de cultivos primarios de CaCu, por lo que sería razonable anticipar la expresión funcional de canales Na_v en las líneas celulares de CaCu, sin embargo, no fue el caso (Sánchez-Sandoval, 2013).

La información existente en otros tipos de cáncer proporcionan evidencias de que esto no es necesariamente una contradicción; por ejemplo en el cáncer de mama (Fraser *et al.*, 2005), de próstata (Laniado *et al.*, 1997) y de pulmón (Roger *et al.*, 2007), de los cuales se han derivado diferentes líneas celulares, se ha reportado que solo aquellas líneas celulares con un potencial invasivo alto expresan corrientes de sodio activadas por voltaje; mientras que las líneas celulares con un potencial invasivo bajo o nulo carecen de ellas. Por otro lado, aun se desconocen muchos factores sobre la regulación de la expresión de los canales Na_v en células cancerosas; por tales motivos, es factible que otras líneas celulares de CaCu diferentes a las exploradas en este estudio, si presenten corrientes generadas por la expresión de canales Na_v, o

bien que se requieran elementos específicos en su cultivo *in vitro* para permitir la expresión de estos canales (Sánchez-Sandoval, 2013).

Al margen de la explicación sobre la ausencia de corrientes de sodio en las líneas celulares de CaCu, las células HeLa representan la primera línea celular generada en un laboratorio de investigación (Lucey *et al.*, 2009) y ha sido caracterizada a detalle en varios aspectos celulares incluyendo su genoma y transcriptoma completo (Laundry *et al.*, 2013), por lo que la información que se tiene sobre ella es lo suficientemente robusta para interpretar resultados de experimentos que impliquen su uso. Por lo tanto, la utilización de las células HeLa como un sistema heterólogo para la expresión de canales Na_v con la finalidad de investigar la participación de éstos en varios fenómenos de la biología del CaCu (migración e invasividad, en concreto), así como los mecanismos que subyacen a estos mismos, resultará de enorme utilidad en el campo de estudio. Aunado a ello, la utilización de líneas celulares permite tener una fuente ilimitada de material biológico (contrario al empleo de cultivos primarios), para probar cualquier hipótesis desde una plataforma que no incorpora variabilidad genética, haciendo clara la visualización de los procesos biológicos estudiados.

Los resultados presentados en este trabajo de tesis demuestran por primera vez que las células HeLa transfectadas con canales Na_v generan corrientes de sodio activadas por voltaje (**Figuras 25 a 28**) con características bastante similares a las expresadas en otros sistemas de expresión, ya sea heterólogos (Smith *et al.*, 1998a; Onkal *et al.*, 2008; Cruz *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2012) o nativos (Lopez-Santiago *et al.*, 2001; Zimmer *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2011). Hubo algunas diferencias importantes entre las corrientes expresadas entre las células HeLa y las células HEK-293, las cuales se utilizaron como punto de comparación. Las discrepancias estribaron principalmente en la amplitud de las corrientes y la cinética de los procesos de activación e inactivación asociados al desarrollo de las corrientes. En general la amplitud de corriente registrada por unidad de área de membrana en las células HeLa transfectadas con canales $\text{Na}_v1.5$ y $\text{Na}_v1.6$ fue significativamente más pequeña que aquellas de las células HEK-293 (**Figuras 25C y 28A**). Esto sucedió así, incluso en células cuya magnitud de corriente fue mayor

en células HeLa que en las HEK-293 (**Figura 25A**). La razón fue que las células HeLa tienen una mayor área de membrana (3-4 veces más) que las células HEK-293. En este aspecto, las células HeLa son parecidas a las células CaCu de cultivos primarios, que también presentan valores de área de membrana considerablemente grandes (Diaz *et al.*, 2007).

Por otra parte, la cinética de la corriente del canal $\text{Na}_v1.6$ presentó los dos componentes de inactivación descritos previamente para este canal, uno rápido y otro mucho más lento (Smith *et al.*, 1998a), en ambos tipos celulares (**Figura 28A**). Por el contrario, la velocidad del proceso de activación fue claramente más lento en las células HeLa (**Figura 28A**). Por su parte, la actividad del canal $\text{Na}_v1.7$ se presentó una corriente cuya inactivación fue drásticamente más lenta que la exhibida por el mismo canal en células HEK-293 (**Figura 28B**). Una posible explicación se relaciona con la expresión y asociación de subunidades β con las subunidades α expresadas heterológicamente en cada caso; así como los complejos multiprotéicos intracelulares que probablemente se estén formado en cada tipo celular (Catterall, 2010). Existen reportes en la literatura que demuestran el efecto modulador de las subunidades β en las propiedades biofísicas de las subunidades α de los canales Na_v (Vijayaragavan *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2011), lo que podría explicar las diferencias observadas entre los dos modelos celulares empleados. Como se mencionó anteriormente las células HeLa expresan niveles moderados de las subunidades $\text{Na}_v\beta1$, $\text{Na}_v\beta2$ y $\text{Na}_v\beta4$, aunque no se tiene información sobre la presencia de la proteína en la membrana plasmática (Sánchez-Sandoval, 2013).

Por otra parte, se ha reportado que un bajo porcentaje de células HEK-293 expresan corrientes endógenas de sodio de mediana magnitud (100-200 pA) que son bloqueadas por TTX (Ukomadu *et al.*, 1992) y se ha reportado la presencia del mensajero para una isoforma de la subunidad $\text{Na}_v\beta1$ (Moran *et al.*, 2000). Por lo tanto, se requiere realizar experimentos en los que se cotransfecten la subunidad α de los canales Na_v con las diferentes subunidades β para determinar el efecto de éstas sobre las propiedades biofísicas de los canales Na_v . Sin embargo, los resultados obtenidos demuestran que las células HeLa constituyen un mejor modelo para la caracterización del papel de los canales Na_v en la biología de cáncer cervical.

CONCLUSIONES

1. Las células de CaCu, de cultivos primarios y de biopsias, expresan canales funcionales de sodio activados por voltaje.
2. Los niveles de mRNA del gen SCN8A (que codifica para el canal Na_v1.6) son aproximadamente 40 veces más altos en el CaCu que en el tejido no canceroso de cérvix uterino.
3. La sobre expresión específica del mensajero del canal Na_v1.6 en el CaCu se correlacionó con una intensa señal de la proteína del canal en la membrana plasmática y compartimientos intracelulares de las células de CaCu en cultivos primarios y en cortes de biopsias.
4. La actividad de los canales Na_v1.6 contribuye con aproximadamente 35% de la corriente total de sodio, y ésta a su vez con el potencial invasivo de las células de CaCu, ya que el bloqueo del flujo de iones a través de dicho canal provocó una disminución significativa de la capacidad invasiva de las células cancerosas.
5. Se implementó una estrategia con potencial terapéutico utilizando un shRNA contenido en un lentivirus con el que se infectaron células de CaCu, lo que produjo una disminución considerable de la expresión del canal Na_v1.6 en las células de CaCu.
6. Mediante la transfección de canales Na_v exógenos, las células HeLa representan uno de los modelos de expresión heteróloga más adecuados para estudiar la participación de los canales Na_v en la biología del CaCu, así como de los mecanismos que subyacen dicha relación.
7. Los canales Na_v1.6 representan un posible marcador molecular y un blanco potencial para el diagnóstico y tratamiento del CaCu.

BIBLIOGRAFÍA

- Bauch, C.T., Li, M., Chapman, G., & Galvani, A.P.** 2010. Adherence to cervical screening in the era of human papillomavirus vaccination: how low is too low? *Lancet Infect Dis* 10:133-137.
- Bennay, M., Langer, J., Meier, S.D., Kafitz, K.W., & Rose, C.R.** 2008. Sodium signals in cerebellar Purkinje neurons and Bergmann glial cells evoked by glutamatergic synaptic transmission. *Glia* 56:1138-1149.
- Bennett, E.S., Smith, B.A., & Harper, J.M.** 2004. Voltage-gated Na⁺ channels confer invasive properties on human prostate cancer cells. *Pflugers Arch* 447:908-914.
- Brackenbury, W.J.** 2012. Voltage-gated sodium channels and metastatic disease. *Channels* 6:352-361.
- Brackenbury, W.J., Calhoun, J.D., Chen, C., Miyazaki, H., Nukina, N., Oyama, F., Ranscht, B., & Isom, L.L.** 2010. Functional reciprocity between Na⁺ channel Nav1.6 and beta1 subunits in the coordinated regulation of excitability and neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:2283-2288.
- Brackenbury, W.J., Chioni, A.M., Diss, J.K., & Djamgoz, M.B.** 2007. The neonatal splice variant of Nav1.5 potentiates in vitro invasive behaviour of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 101:149-160.
- Brackenbury, W.J., Djamgoz, M.B., & Isom, L.L.** 2008. An emerging role for voltage-gated Na⁺ channels in cellular migration: regulation of central nervous system development and potentiation of invasive cancers. *Neuroscientist* 14:571-583.
- Brackenbury, W.J. & Isom, L.L.** 2008. Voltage-gated Na⁺ channels: potential for beta subunits as therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets* 12:1191-1203.
- Burchell, A.N., Winer, R.L., de Sanjose, S., & Franco, E.L.** 2006. Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine* 24:52-61.
- 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. *J Biol Chem* 284:8114-8126.
- Carrithers, M.D., Dib-Hajj, S., Carrithers, L.M., Tokmoulina, G., Pypaert, M., Jonas, E.A., & Waxman, S.G.** 2007. Expression of the voltage-gated sodium channel Nav1.5 in the macrophage late endosome regulates endosomal acidification. *J Immunol* 178:7822-7832.
- Catterall, W.A.** 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26:13-25.
- Catterall, W.A.** 2010. Signaling complexes of voltage-gated sodium and calcium channels. *Neuroscience Letters* 486:107-116.
- Catterall, W.A.** 2012. Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *Journal of Physiology-London* 590:2577-2589.
- Catterall, W.A., Goldin, A.L., & Waxman, S.G.** 2003. International Union of Pharmacology. XXXIX. Compendium of voltage-gated ion channels: sodium channels. *Pharmacol Rev* 55:575-578.
- Catterall, W.A., Goldin, A.L., & Waxman, S.G.** 2005. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 57:397-409.
- Chatelier, A., Dahllund, L., Eriksson, A., Krupp, J., & Chahine, M.** 2008. Biophysical properties of human Na^v1.7 splice variants and their regulation by protein kinase A. *J Neurophysiol* 99:2241-2250.
- Chaudhary, J. & Schmidt, M.** 2006. The impact of genomic alterations on the transcriptome: a prostate cancer cell line case study. *Chromosome Res* 14:567-586.
- Chioni, A.M., Brackenbury, W.J., Calhoun, J.D., Isom, L.L., & Djamgoz, M.B.** 2009. A novel adhesion molecule in human breast cancer cells: voltage-gated Na⁺ channel beta1 subunit. *Int J Biochem Cell Biol* 41:1216-1227.
- Chioni, A.M., Shao, D., Grose, R., & Djamgoz, M.B.** 2010. Protein kinase A and regulation of neonatal Nav1.5 expression in human breast cancer cells: activity-dependent positive feedback and cellular migration. *Int J Biochem Cell Biol* 42:346-358.
- Craner, M.J., Hains, B.C., Lo, A.C., Black, J.A., & Waxman, S.G.** 2004a. Co-localization of sodium channel Nav1.6 and the sodium-calcium exchanger at sites of axonal injury in the spinal cord in EAE. *Brain* 127:294-303.
- Craner, M.J., Newcombe, J., Black, J.A., Hartle, C., Cuzner, M.L., & Waxman, S.G.** 2004b. Molecular changes in neurons in multiple sclerosis: altered axonal expression of Nav1.2 and Nav1.6 sodium channels and Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8168-8173.

- Crociani, O., Guasti, L., Balzi, M., Becchetti, A., Wanke, E., Olivotto, M., Wymore, R.S., & Arcangeli, A.** 2003. Cell cycle-dependent expression of HERG1 and HERG1B isoforms in tumor cells. *J Biol Chem* 278:2947-2955.
- Cruz, J.S., Silva, D.F., Ribeiro, L.A., Araujo, I.G.A., Magalhaes, N., Medeiros, A., Freitas, C., Araujo, I.C., & Oliveira, F.A.** 2011. Resurgent Na⁺ current: A new avenue to neuronal excitability control. *Life Sciences* 89:564-569.
- Cuddapah, V.A. & Sontheimer, H.** 2011. Ion channels and transporters in cancer. 2. Ion channels and the control of cancer cell migration. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 301:C541-C549.
- de Kok, J.B., Roelofs, R.W., Giesendorf, B.A., Pennings, J.L., Waas, E.T., Feuth, T., Swinkels, D.W., & Span, P.N.** 2005. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Laboratory Investigation* 85:154-159.
- de la Vega, R.C. & Possani, L.D.** 2007. Novel paradigms on scorpion toxins that affects the activating mechanism of sodium channels. *Toxicon* 49:171-180.
- de Villiers, E.M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.U., & zur Hausen, H.** 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17-27.
- Diaz, D., Delgadillo, D.M., Hernandez-Gallegos, E., Ramirez-Dominguez, M.E., Hinojosa, L.M., Ortiz, C.S., Berumen, J., Camacho, J., & Gomora, J.C.** 2007. Functional expression of voltage-gated sodium channels in primary cultures of human cervical cancer. *J Cell Physiol* 210:469-478.
- Diaz, L., Ceja-Ochoa, I., Restrepo-Angulo, I., Larrea, F., Avila-Chavez, E., Garcia-Becerra, R., Borja-Cacho, E., Barrera, D., Ahumada, E., Gariglio, P., Alvarez-Rios, E., Ocadiz-Delgado, R., Garcia-Villa, E., Hernandez-Gallegos, E., Camacho-Arroyo, I., Morales, A., Ordaz-Rosado, D., Garcia-Latorre, E., Escamilla, J., Sanchez-Pena, L.C., Saqui-Salces, M., Gamboa-Dominguez, A., Vera, E., Uribe-Ramirez, M., Murbartian, J., Ortiz, C.S., Rivera-Guevara, C., Vizcaya-Ruiz, A., & Camacho, J.** 2009. Estrogens and human papilloma virus oncogenes regulate human ether-a-go-go-1 potassium channel expression. *Cancer Res* 69:3300-3307.
- Ding, Y., Brackenbury, W.J., Onganer, P.U., Montano, X., Porter, L.M., Bates, L.F., & Djamgoz, M.B.** 2008. Epidermal growth factor upregulates motility of Mat-LyLu rat prostate cancer cells partially via voltage-gated Na⁺ channel activity. *J Cell Physiol* 215:77-81.
- Diss, J.K., Archer, S.N., Hirano, J., Fraser, S.P., & Djamgoz, M.B.** 2001. Expression profiles of voltage-gated Na⁽⁺⁾ channel alpha-subunit genes in rat and human prostate cancer cell lines. *Prostate* 48:165-178.
- Diss, J.K., Fraser, S.P., & Djamgoz, M.B.** 2004. Voltage-gated Na⁺ channels: multiplicity of expression, plasticity, functional implications and pathophysiological aspects. *Eur Biophys J* 33:180-193.
- Diss, J.K., Fraser, S.P., Walker, M.M., Patel, A., Latchman, D.S., & Djamgoz, M.B.** 2008. Beta-subunits of voltage-gated sodium channels in human prostate cancer: quantitative in vitro and in vivo analyses of mRNA expression. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 11:325-333.
- Diss, J.K., Stewart, D., Pani, F., Foster, C.S., Walker, M.M., Patel, A., & Djamgoz, M.B.** 2005. A potential novel marker for human prostate cancer: voltage-gated sodium channel expression in vivo. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 8:266-273.
- Doorbar, J.** 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science* 110:525-541.
- Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D., & Sharp, P.A.** 2003. Killing the messenger: Short RNAs that silence gene expression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4:457-467.
- Farias, L.M., Ocana, D.B., Diaz, L., Larrea, F., Avila-Chavez, E., Cadena, A., Hinojosa, L.M., Lara, G., Villanueva, L.A., Vargas, C., Hernandez-Gallegos, E., Camacho-Arroyo, I., Duenas-Gonzalez, A., Perez-Cardenas, E., Pardo, L.A., Morales, A., Taja-Chayeb, L., Escamilla, J., Sanchez-Pena, C., & Camacho, J.** 2004. Ether a go-go potassium channels as human cervical cancer markers. *Cancer Res* 64:6996-7001.
- Fiske, J.L., Fomin, V.P., Brown, M.L., Duncan, R.L., & Sikes, R.A.** 2006. Voltage-sensitive ion channels and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 25:493-500.
- Fraser, S.P., Ding, Y., Liu, A., Foster, C.S., & Djamgoz, M.B.** 1999. Tetrodotoxin suppresses morphological enhancement of the metastatic MAT-LyLu rat prostate cancer cell line. *Cell Tissue Res* 295:505-512.
- Fraser, S.P., Diss, J.K., Chioni, A.M., Mycielska, M.E., Pan, H., Yamaci, R.F., Pani, F., Siwy, Z., Krasowska, M., Grzywna, Z., Brackenbury, W.J., Theodorou, D., Koyuturk, M., Kaya, H., Battaloglu, E., De Bella, M.T., Slade, M.J., Tolhurst, R., Palmieri, C., Jiang, J., Latchman, D.S., Coombes, R.C., & Djamgoz, M.B.** 2005. Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 11:5381-5389.
- Fraser, S.P., Diss, J.K., Lloyd, L.J., Pani, F., Chioni, A.M., George, A.J., & Djamgoz, M.B.** 2004. T-lymphocyte invasiveness: control by voltage-gated Na⁺ channel activity. *FEBS Lett* 569:191-194.

- Fraser, S.P. & Pardo, L.A.** 2008. Ion channels: functional expression and therapeutic potential in cancer. Colloquium on Ion Channels and Cancer. *EMBO Rep* 9:512-515.
- Fulgenzi, G., Graciotti, L., Faronato, M., Soldovieri, M.V., Miceli, F., Amoroso, S., Annunziato, L., Procopio, A., & Tagliatela, M.** 2006. Human neoplastic mesothelial cells express voltage-gated sodium channels involved in cell motility. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38:1146-1159.
- Gao, R., Shen, Y., Cai, J., Lei, M., & Wang, Z.** 2010. Expression of voltage-gated sodium channel alpha subunit in human ovarian cancer. *Oncol Rep* 23:1293-1299.
- Gazina, E.V., Richards, K.L., Mokhtar, M.B., Thomas, E.A., Reid, C.A., & Petrou, S.** 2010. Differential expression of exon 5 splice variants of sodium channel alpha subunit mRNAs in the developing mouse brain. *Neuroscience* 166:195-200.
- Gillet, L., Roger, S., Besson, P., Lecaille, F., Gore, J., Bougnoux, P., Lalmanach, G., & Le Guennec, J.Y.** 2009. Voltage-gated Sodium Channel Activity Promotes Cysteine Cathepsin-dependent Invasiveness and Colony Growth of Human Cancer Cells. *J Biol Chem* 284:8680-8691.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., & Bujard, H.** 1995. Transcriptional Activation by Tetracyclines in Mammalian-Cells. *Science* 268:1766-1769.
- Grimes, J.A., Fraser, S.P., Stephens, G.J., Downing, J.E., Laniado, M.E., Foster, C.S., Abel, P.D., & Djamgoz, M.B.** 1995. Differential expression of voltage-activated Na⁺ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro. *FEBS Lett* 369:290-294.
- Guo, C.M., Liu, S.Q., Wang, J.S., Sun, M.Z., & Greenaway, F.T.** 2013. ACTB in cancer. *Clinica Chimica Acta* 417:39-44.
- Gustafson, T.A., Clevinger, E.C., O'Neill, T.J., Yarowsky, P.J., & Krueger, B.K.** 1993. Mutually exclusive exon splicing of type III brain sodium channel alpha subunit RNA generates developmentally regulated isoforms in rat brain. *J Biol Chem* 268:18648-18653.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F.J.** 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100.
- Hannon, G.J. & Rossi, J.J.** 2004. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 431:371-378.
- Hernández Plata, E.** 2008. Expresión diferencial de canales de sodio dependientes de voltaje en cáncer cervicouterino. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Hille, B.** 2001. Ion Channels of Excitable Membranes. 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Ho, C.J., Zhao, J., Malinowski, S., Chahine, M., & O'Leary, M.E.** 2012. Differential Expression of Sodium Channel beta Subunits in Dorsal Root Ganglion Sensory Neurons. *J Biol Chem* 287:15044-15053.
- House, C.D., Vaske, C.J., Schwartz, A.M., Obias, V., Frank, B., Luu, T., Sarvazyan, N., Irby, R., Strausberg, R.L., Hales, T.G., Stuart, J.M., & Lee, N.H.** 2010. Voltage-gated Na⁺ channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion. *Cancer Res* 70:6957-6967.
- Jansson, K.H., Lynch, J.E., Lepori-Bui, N., Czymmek, K.J., Duncan, R.L., & Sikes, R.A.** 2012. Overexpression of the VSSC-associated CAM, beta-2, enhances LNCaP cell metastasis associated behavior. *Prostate* 72:1080-1092.
- Jurkat-Rott, K. & Lehmann-Horn, F.** 2001. Human muscle voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Curr Opin Pharmacol* 1:280-287.
- Kaczmarek, L.K.** 2006. Non-conducting functions of voltage-gated ion channels. *Nat Rev Neurosci* 7:761-771.
- Kay, M.A., Glorioso, J.C., & Naldini, L.** 2001. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature Medicine* 7:33-40.
- Laniado, M.E., Lalani, E.N., Fraser, S.P., Grimes, J.A., Bhangal, G., Djamgoz, M.B., & Abel, P.D.** 1997. Expression and functional analysis of voltage-activated Na⁺ channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion in vitro. *Am J Pathol* 150:1213-1221.
- Laundry, J., Pyl, P.T., Rausch, T., Zichner, T., Tekkedil, M.M., Stutz, A.M., Jauch, A., Aiyar, R.S., Pau, G., Delhomme, N., Gagneur, J., Korbel, J.O., Huber, W., & Steinmetz, L.M.** 2013. The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *Genes, Genome, Genetics* doi:10.1534/g3.113.005777.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- Lopez-Santiago, L.F., Gomora, J.C., & Cota, G.** 2001. Postnatal decrease of sodium current density in rat pituitary melanotopes following the onset of dopaminergic innervation. *Neuroscience Letters* 315:137-140.

- Lucey, B.P., Nelson-Rees, W.A., & Hutchins, G.M.** 2009. Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 133:1463-1467.
- Mahdavi, A. & Monk, B.J.** 2005. Vaccines against human papillomavirus and cervical cancer: promises and challenges. *Oncologist* 10:528-538.
- Marty, A. and E. Neher.** 1995. Tight-seal whole-cell recording. In *Single Channel Recording*. B. Sakmann and E. Neher, editors. Plenum Press, New York. 31-52.
- Moran, O., Nizzari, M., & Conti, F.** 2000. Endogenous expression of the beta 1A sodium channel subunit in HEK-293 cells. *Febs Letters* 473:132-134.
- Nikolaeva, M.A., Mukherjee, B., & Stys, P.K.** 2005. Na⁺-dependent sources of intra-axonal Ca²⁺ release in rat optic nerve during in vitro chemical ischemia. *J Neurosci* 25:9960-9967.
- Onganer, P.U. & Djamgoz, M.B.** 2005. Small-cell lung cancer (human): potentiation of endocytic membrane activity by voltage-gated Na⁺ channel expression in vitro. *J Membr Biol* 204:67-75.
- Onkal, R., Mattis, J.H., Fraser, S.P., Diss, J.K., Shao, D., Okuse, K., & Djamgoz, M.B.** 2008. Alternative splicing of Nav1.5: an electrophysiological comparison of 'neonatal' and 'adult' isoforms and critical involvement of a lysine residue. *J Cell Physiol* 216:716-726.
- Ou, S.W., Kameyama, A., Hao, L.Y., Horiuchi, M., Minobe, E., Wang, W.Y., Makita, N., & Kameyama, M.** 2005. Tetrodotoxin-resistant Na⁺ channels in human neuroblastoma cells are encoded by new variants of Nav1.5/SCN5A. *European Journal of Neuroscience* 22:793-801.
- Pardo, L.A., Bruggemann, A., Camacho, J., & Stuhmer, W.** 1998. Cell cycle-related changes in the conducting properties of r-eag K⁺ channels. *J Cell Biol* 143:767-775.
- Patino, G.A. & Isom, L.L.** 2010. Electrophysiology and beyond: Multiple roles of Na⁺ channel beta subunits in development and disease. *Neuroscience Letters* 486:53-59.
- Piacentino, V., III, Weber, C.R., Gaughan, J.P., Margulies, K.B., Bers, D.M., & Houser, S.R.** 2002. Modulation of contractility in failing human myocytes by reverse-mode Na/Ca exchange. *Ann N Y Acad Sci* 976:466-471.
- 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. *J Biol Chem* 272:24008-24015.
- Prevarskaya, N., Skryma, R., & Shuba, Y.** 2010. Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends Mol Med* 16:107-121.
- Qin, N., D'Andrea, M.R., Lubin, M.L., Shafae, N., Codd, E.E., & Correa, A.M.** 2003. Molecular cloning and functional expression of the human sodium channel beta1B subunit, a novel splicing variant of the beta1 subunit. *Eur J Biochem* 270:4762-4770.
- Quinn, M.A., Benedet, J.L., Odicino, F., Maisonneuve, P., Beller, U., Creasman, W.T., Heintz, A.P., Ngan, H.Y., & Pecorelli, S.** 2006. Carcinoma of the cervix uteri. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet* 95 Suppl 1:S43-103.
- Rajkumar, T., Appleby, P., Beral, V., Berrington, D.A., Bull, D., Crossley, B., Green, J., Reeves, G., Sweetland, S., Kjaer, S., Peto, J., Painter, R., Vessey, M., Daling, J., Madeleine, M., Ray, R., Thomas, D., Hutchinson, F., Hererro, R., Ylitalo, N., Bosch, F.X., Castellsague, X., Hammouda, D., Peto, J., Negri, E., Peto, J., Santos, C., Colin, D., Franceschi, S., Munoz, N., Plummer, M., Dillner, J., Bayo, S., Chaouki, N., Rolon, P., Brinton, L., Hildesheim, A., Lacey, J., Schiffman, M., Stein, L., Hannaford, P., Chichareon, S., Sitas, F., Eluf-Neto, J., La Vecchia, C., Skegg, D., Pike, M., Ursin, G., Ngelangel, C., Farley, T., & Meirik, O.** 2006. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: Collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies - International collaboration of epidemiological studies of cervical cancer. *International Journal of Cancer* 118:1481-1495.
- Raymond, C.K., Castle, J., Garrett-Engle, P., Armour, C.D., Kan, Z., Tsinoremas, N., & Johnson, J.M.** 2004. Expression of alternatively spliced sodium channel alpha-subunit genes. Unique splicing patterns are observed in dorsal root ganglia. *J Biol Chem* 279:46234-46241.
- Roden, R. & Wu, T.C.** 2006. How will HPV vaccines affect cervical cancer? *Nat Rev Cancer* 6:753-763.
- Roger, S., Besson, P., & Le Guennec, J.Y.** 2003. Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. *Biochim Biophys Acta* 1616:107-111.
- Roger, S., Rollin, J., Barascu, A., Besson, P., Raynal, P.I., Iochmann, S., Lei, M., Bougnoux, P., Gruel, Y., & Le Guennec, J.Y.** 2007. Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines. *Int J Biochem Cell Biol* 39:774-786.

- Rubinson, D.A., Dillon, C.P., Kwiatkowski, A.V., Sievers, C., Yang, L., Kopinja, J., McManus, M.T., Gertler, F.B., Scott, M.L., & Van Parijs, L. 2003. A lentivirus-based system to silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference (vol 33, pg 401, 2003). *Nature Genetics* 34:231.
- Sánchez-Sandoval, A.L. 2011. Expresión de canales de sodio en cáncer cervicouterino generado por VPH-18. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sánchez-Sandoval, A.L. 2013. Participación de los canales de sodio activados por voltaje en las propiedades metastásicas de líneas celulares de cáncer cervicouterino: regulación por estradiol, EGF y subunidades beta. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- 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 Res* 19:5673-5679.
- Scherr, M., Battmer, K., Ganser, A., & Eder, M. 2003. Modulation of gene expression by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA. *Molecular Therapy* 7:S19.
- Schiavon, E., Sacco, T., Cassulini, R.R., Gurrola, G., Tempia, F., Possani, L.D., & Wanke, E. 2006. Resurgent current and voltage sensor trapping enhanced activation by a beta-scorpion toxin solely in Nav1.6 channel. Significance in mice Purkinje neurons. *J Biol Chem* 281:20326-20337.
- Schiffman, M., Castle, P.E., Jeronimo, J., Rodriguez, A.C., & Wacholder, S. 2007. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 370:890-907.
- Schwab, A. 2001. Function and spatial distribution of ion channels and transporters in cell migration. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 280:F739-F747.
- Shen, M.R., Droogmans, G., Eggermont, J., Voets, T., Ellory, J.C., & Nilius, B. 2000. Differential expression of volume-regulated anion channels during cell cycle progression of human cervical cancer cells. *J Physiol* 529 Pt 2:385-394.
- Shen, M.R., Wu, S.N., & Chou, C.Y. 1996. Volume-sensitive chloride channels in the primary culture cells of human cervical carcinoma. *Biochim Biophys Acta* 1315:138-144.
- Smith, M.R., Smith, R.D., Plummer, N.W., Meisler, M.H., & Goldin, A.L. 1998a. Functional analysis of the mouse Scn8a sodium channel. *J Neurosci* 18:6093-6102.
- Smith, P., Rhodes, N.P., Shortland, A.P., Fraser, S.P., Djamgoz, M.B., Ke, Y., & Foster, C.S. 1998b. Sodium channel protein expression enhances the invasiveness of rat and human prostate cancer cells. *FEBS Lett* 423:19-24.
- Stanley, M.A., Pett, M.R., & Coleman, N. 2007. HPV: from infection to cancer. *Biochem Soc Trans* 35:1456-1460.
- Stys, P.K., Waxman, S.G., & Ransom, B.R. 1992. Ionic mechanisms of anoxic injury in mammalian CNS white matter: role of Na⁺ channels and Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger. *J Neurosci* 12:430-439.
- Suzuki, T. & Takimoto, K. 2004. Selective expression of HERG and Kv2 channels influences proliferation of uterine cancer cells. *Int J Oncol* 25:153-159.
- Zulc, J. & Aebischer, P. 2008. Conditional gene expression and knockdown using lentivirus vectors encoding shRNA. *Methods Mol Biol* 434:291-309.
- Toniatti, C., Bujard, H., Cortese, R., & Ciliberto, G. 2004. Gene therapy progress and prospects: transcription regulatory systems. *Gene Therapy* 11:649-657.
- Ukomadu, C., Zhou, J.Y., Sigworth, F.J., & Agnew, W.S. 1992. Mu-I Na⁺ Channels Expressed Transiently in Human Embryonic Kidney-Cells - Biochemical and Biophysical Properties. *Neuron* 8:663-676.
- Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M.T., Bujard, H., & Hillen, W. 2000. Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: Novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:7963-7968.
- Valente, V., Teixeira, S.A., Neder, L., Okamoto, O.K., Oba-Shinjo, S.M., Marie, S.K., Scrideli, C.A., Paco-Larson, M.L., & Carlotti, C.G., Jr. 2009. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. *BMC Mol Biol* 10:17.
- Van den Haute, C., Eggermont, K., Nuttin, B., Debysier, Z., & Baekelandt, V. 2003. Lentiviral vector-mediated delivery of short hairpin RNA results in persistent knockdown of gene expression in mouse brain. *Human Gene Therapy* 14:1799-1807.
- Vijayaragavan, K., O'Leary, M.E., & Chahine, M. 2001. Gating properties of Na(v)1.7 and Na(v)1.8 peripheral nerve sodium channels. *Journal of Neuroscience* 21:7909-7918.
- Viswanathan, P.C. & Balsler, J.R. 2004. Inherited sodium channelopathies: a continuum of channel dysfunction. *Trends Cardiovasc Med* 14:28-35.

- Waxman, S.G., Black, J.A., Stys, P.K., & Ransom, B.R.** 1992. Ultrastructural concomitants of anoxic injury and early post-anoxic recovery in rat optic nerve. *Brain Res* 574:105-119.
- Wehrens, X.H., Rossenbacker, T., Clancy, C.E., Jongbloed, R.J.E., Vos, M.A., Doevendans, P.A., & Kass, R.S.** 2002. A novel mutation L619F in the cardiac Na plus channel SCN5A underlies long-QT syndrome (LQT3): A role for the I-II linker in inactivation gating. *Biophysical Journal* 82:353A.
- Weisser-Thomas, J., Piacentino, V., III, Gaughan, J.P., Margulies, K., & Houser, S.R.** 2003. Calcium entry via Na/Ca exchange during the action potential directly contributes to contraction of failing human ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 57:974-985.
- Woodman, C.B., Collins, S.I., & Young, L.S.** 2007. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7:11-22.
- Yildirim, S., Altun, S., Gumushan, H., Patel, A., & Djamgoz, M.B.A.** 2012. Voltage-gated sodium channel activity promotes prostate cancer metastasis in vivo. *Cancer Letters* 323:58-61.
- Yu, F.H. & Catterall, W.A.** 2003. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol* 4:207.
- Zandberg, D.P., Bhargava, R., Badin, S., & Cullen, K.J.** 2013. The role of human papillomavirus in nongenital cancers. *Ca-A Cancer Journal for Clinicians* 63:57-81.
- Zhang, Z.N., Li, Q., Liu, C., Wang, H.B., Wang, Q., & Bao, L.** 2008. The voltage-gated Na(+) channel Na(v)1.8 contains an ER-retention/retrieval signal antagonized by the beta 3 subunit. *Journal of Cell Science* 121:3243-3252.
- Zhao, J., O'Leary, M.E., & Chahine, M.** 2011. Regulation of Na(v)1.6 and Na(v)1.8 peripheral nerve Na+ channels by auxiliary beta-subunits. *Journal of Neurophysiology* 106:608-619.
- Zimmer, T., Biskup, C., Bollensdorff, C., & Benndorf, K.** 2002. The beta1 subunit but not the beta2 subunit colocalizes with the human heart Na+ channel (hH1) already within the endoplasmic reticulum. *J Membr Biol* 186:13-21.

APÉNDICES

1. Solicitud de Patente ante el IMPI.
2. Artículo de Investigación en *International Journal of Cancer*.
3. Artículo de Revisión en *Revista de Investigación Clínica*.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Dr. Juan Carlos Gómora quien guió mis pasos durante mi desarrollo profesional, me brindó todo el apoyo necesario para comenzar un camino en el mundo de la ciencia y me ha brindado su amistad más allá del área de trabajo.

Al Dr. Edward Pérez Reyes, quien me permitió enriquecer mi percepción del mundo de la ciencia, y junto con Deby, Mariza, Selena y Alejandro, me brindaron una experiencia excepcional durante mi estancia en los Estados Unidos.

A mis padres Evita y Gil que siempre me han brindado su apoyo incondicional y me han animado a perseguir mis objetivos.

A mi hermana Evita que siempre ha respaldado mis pasos y con quien tengo una conexión psíquica.

A mis tías Angelita, Ofe, Glorera, Tere y Lupita que siempre han sido mis hadas madrinas, me han apoyado, consentido y aconsejado muchas veces.

A mis abuelos que me han brindado su cariño y me han dado el mayor ejemplo de la formación de una familia unida y armoniosa.

A mis primos, cómplices de vida y leales compañeros de fiesta.

A Lau, quien es mi más cercana colega y confidente, a quien debo grandes momentos y buenas discusiones.

A mis amigos y compañeros del laboratorio Angelita, Ima, Chabe, Gaby, Sarahí Rosas, Yendi, Sarahí González, Jonatán, Osbaldo, Kiyoshi, Rogelio, Saúl, Fer y Lalo, con quienes he compartido la mesa de trabajo y muchos momentos de alegría inolvidables.

A Clarita, quien más allá de su gran apoyo profesional, me ha brindado una gran amistad que ha salido del laboratorio.

A Dulce, Zaz, Xochitl, y Luci, quienes han desempeñado un trabajo formidable y me han brindado un gran apoyo en el desarrollo de mi proyecto.

A mis amigos que han compartido conmigo conocimiento, discusiones, alegrías y tristezas.

A Lety García, quien me ha brindado un apoyo excepcional durante todo mi posgrado.

A todos mis maestros, a quienes debo mi formación académica.

A mi país México, al que me declaro adicto.



INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
Dirección Divisional de Patentes

Solicitud
Expediente: MX/a/2011/002380
Fecha: 3/MAR/2011 Hora: 11:20
Folio: MX/E/2011/014896 446372



Solicitud de Patente
 Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad

Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique cuál:
 Modelo Industrial Dibujo Industrial

Uso exclusivo Delegaciones y Subdelegaciones de la Secretaría de Economía y Oficinas Regionales del IMPI

Sello

Folio de entrada

Fecha y hora de recepción

Antes de llenar la forma lea las consideraciones generales al reverso

I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)

El solicitante es el inventor El solicitante es el causahabiente

1) Nombre (s): UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
2) Nacionalidad (es): MEXICANA.
3) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: 9º PISO DE LA TORRE DE RECTORÍA S/N, CIUDAD UNIVERSITARIA, DELEGACIÓN COYOACÁN, C.P. 04510
Población, Estado y País: MÉXICO, DISTRITO FEDERAL
4) Teléfono (clave): 56 22 63 29 AL 31 5) Fax (clave): 56 65 46 44

II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)

6) Nombre (s): JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ, EVERARDO HERNÁNDEZ PLATA, HERIBERTO MANUEL RIVERA y CINDY SHARON ORTIZ ARCE.
7) Nacionalidad (es): MEXICANA, MEXICANA, MEXICANA y MEXICANA.
8) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: 3ª CDA DE EMILIO CARRANZA N° 60, INT. 403 B, SAN ANDRÉS TETEPILCO, C.P. 09440
Población, Estado y País: IZTAPALAPA, DISTRITO FEDERAL, MÉXICO.
9) Teléfono (clave): 10) Fax (clave):

III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO(S)

11) Nombre (s): LIC. ALEJANDRO FERNÁNDEZ VARELA JIMÉNEZ 12) R G P: DDJ-14782
13) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: EDIFICIO "B" 3er. PISO, ZONA CULTURAL DE CIUDAD UNIVERSITARIA, DELEGACIÓN COYOACÁN, C.P. 04510.
Población, Estado y País: MÉXICO, DISTRITO FEDERAL 14) Teléfono (clave): 56 22 63 29 AL 31 15) Fax (clave): 56 65 46 44
16) Personas Autorizadas para oír y recibir notificaciones: LIC. CLAUDIA LIZBETH LLANOS ARGÜELLO, LIC. MARTHA FIGUEROA PÉREZ, LIC. ROCIO JUÁREZ VÁZQUEZ y LIC. YESICA MARIBEL CORONEL RIVERA.

17) Denominación o Título de la Invención: "MARCADOR MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN DEL CÁNCER CERVICOUTERINO"

18) Fecha de divulgación previa: 03 / 03 / 2010
19) Clasificación Internacional: uso exclusivo del IMPI

20) Divisional de la solicitud: Número _____ Figura jurídica _____ Día / Mes / Año _____
21) Fecha de presentación: Día / Mes / Año _____

22) Prioridad Reclamada: País _____ Fecha de presentación: Día / Mes / Año _____ No. de serie _____

Lista de verificación (uso interno)

No. Hojas		No. Hojas	
X	1	X	4
X	23		
X	4	X	9
X	1		
X	1		
			43
			TOTAL DE HOJAS

Observaciones:

Bajo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos asentados en esta solicitud son ciertos.

LIC. ALEJANDRO FERNÁNDEZ VARELA JIMÉNEZ CD. UNIVERSITARIA, D.F. A 1 DE MARZO DE 2011
Nombre y firma del solicitante o su apoderado Lugar y fecha

Overexpression of Na_v1.6 channels is associated with the invasion capacity of human cervical cancer

Everardo Hernandez-Plata¹, Cindy S. Ortiz², Brenda Marquina-Castillo², Ingrid Medina-Martinez³, Ana Alfaro³, Jaime Berumen³, Manuel Rivera¹ and Juan C. Gomora¹

¹División de Neurociencias, Departamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, México

²Departamento de Patología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México, DF, México

³Unidad de Medicina Genómica, Hospital General de México/Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, México

Functional activity of voltage-gated sodium channels (VGSC) has been associated to the invasion and metastasis behaviors of prostate, breast and some other types of cancer. We previously reported the functional expression of VGSC in primary cultures and biopsies derived from cervical cancer (CaC). Here, we investigate the relative expression levels of VGSC subunits and its possible role in CaC. Quantitative real-time PCR revealed that mRNA levels of Na_v1.6 α -subunit in CaC samples were ~40-fold higher than in noncancerous cervical (NCC) biopsies. A Na_v1.7 α -subunit variant also showed increased mRNA levels in CaC (~20-fold). All four Na_v β subunits were also detected in CaC samples, being Na_v β 1 the most abundant. Proteins of Na_v1.6 and Na_v1.7 α -subunits were immunolocalized in both NCC and CaC biopsies and in CaC primary cultures as well; however, although in NCC sections proteins were mainly relegated to the plasma membrane, in CaC biopsies and primary cultures the respective signal was stronger and widely distributed in both cytoplasm and plasma membrane. Functional activity of Na_v1.6 channels in the plasma membrane of CaC cells was confirmed by whole-cell patch-clamp experiments using Cn2, a Na_v1.6-specific toxin, which blocked ~30% of the total sodium current. Blocking of sodium channels VGSC with tetrodotoxin and Cn2 did not affect proliferation neither migration, but reduced by ~20% the invasiveness of CaC primary culture cells *in vitro* assays. We conclude that Na_v1.6 is upregulated in CaC and could serve as a novel molecular marker for the metastatic behavior of this carcinoma.

Cervical cancer (CaC) is the third most common female tumor worldwide and the second in developing countries, with an estimated annual incidence of 452,000 cases.¹ In view of

Key words: cervical cancer, Na_v1.6, invasiveness, molecular marker, Na_v1.7

Abbreviations: CaC: cervical cancer; Cn2: B-class toxin from the scorpion *Centruroides noxius*; *HPRT1*: hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; HPV: human papillomavirus; Na_v1.6: voltage-gated sodium channel α -subunit encoded by the *SCN8A* gene; Na_v β 1: voltage-gated sodium channel β -subunit encoded by the *SCN1B* gene; NCC: noncancerous cervix; TTX: tetrodotoxin; VGSC: voltage-gated sodium channels

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article

Conflicts of interest: None

Grant sponsor: Instituto de Ciencia y Tecnología del DF (ICYTDF);

Grant number: PICDS08-28; **Grant sponsor:** Dirección General de Asuntos del Personal Académico of the Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM); **Grant number:** IN206008

DOI: 10.1002/ijc.26210

History: Received 16 Mar 2011; Accepted 16 May 2011; Online 31 May 2011

Correspondence to: Juan C. Gomora, División de Neurociencias, Departamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Mexico City, 04510 México, Tel.: +(52-55)-5622-5752, Fax: +(52-55)-5622-5607, E-mail: jgomora@ifc.unam.mx

the finding that carcinogenic human papillomavirus (HPV) infections cause virtually all CaC cases, recently a new approach for CaC prevention has emerged with the HPV vaccination of younger women (aged ≤ 18 years).² Despite the highly significant advance that the vaccine itself represents, a mathematical model has predicted an increase in CaC incidence if vaccination is not followed by a continuous Pap smear screening program.³ Therefore, the finding of effective diagnosis and therapeutic strategies for CaC still remains as a priority.

Lately, there has been an increasing amount of evidences that correlate the function of ion channels with several aspects of cancer progression.^{4,5} In particular, voltage-gated sodium channels (VGSC) have been clearly associated to invasion and metastasis behaviors in several types of cancer, including breast, colon, lung, ovary and prostate.⁶⁻¹⁰ Sodium channels are protein complexes formed by a large α -subunit and smaller auxiliary β -subunits. The α -subunit alone is sufficient to form a functional channel, but its biophysical properties, trafficking and anchoring to the cell membrane are modulated by β -subunits.¹¹ The VGSC family is composed by nine different α -subunits (Na_v1.1–Na_v1.9) and four β -subunits (Na_v β 1–Na_v β 4); all of them have been cloned, functionally expressed and characterized.¹² A useful tool to discriminate among VGSC is their sensitivity to tetrodotoxin (TTX); Na_v1.1–Na_v1.4, Na_v1.6 and Na_v1.7 are blocked by nanomolar concentrations of TTX, whereas Na_v1.5, Na_v1.8

and Na_v1.9 demand micromolar concentrations of toxin for being blocked.¹²

Prostate cancer cells have been reported to specifically overexpress Na_v1.7 subunits, whereas in breast, colon and ovary the Na_v1.5 subunit is mostly overexpressed; in addition, substantial evidence supports the contribution of such VGSC in the *in vitro* invasiveness of cell lines derived from these carcinomas.^{6,7,10,13} We recently reported the presence of functional VGSC in primary cultures of CaC and the overexpression of several VGSC α -subunits in CaC biopsies and primary cultures, in comparison with noncancerous cervix (NCC) biopsies.¹⁴ Now, the goal of our study was to establish whether a particular VGSC α -subunit is specifically overexpressed in CaC biopsies and primary cultures, and if they have any contribution to the metastasis behavior of this carcinoma. Importantly, we have used primary cultures, not cell lines, derived from CaC, and for the first time we have demonstrated a role for VGSC, particularly Na_v1.6 channels, in invasiveness of a non-cell line carcinoma.

Material and Methods

Biological samples

Biopsies were obtained from patients with invasive CaC diagnosed at the Oncology Unit of the Hospital General in Mexico City. For our study, only HPV-16-positive biopsies from patients who had not received any anticancer therapy were used. NCC biopsies were obtained by hysterectomy from patients of the same hospital, all of them with pap smear test negative to cancer. Our study was approved by the Institutional Ethics Committee on Human Research, and informed written consent was obtained from all patients.

Primary cultures

CaC cultures were obtained by thawing cells from previously established primary cultures; these cells were formerly characterized to express cytokeratins and the E7 gene from HPV-16,¹⁵ supporting the cancer epithelial nature of the cells. Herein, CaC cells from these cultures will be called 085, 354 and JP cells. Cells were grown in DMEM with 10% fetal bovine serum (FBS) and kept in a CO₂ incubator at 37°C. Every 6–7 days the maintenance cultures were regenerated by replating cells at tenfold lower density. For recording purposes, an aliquot of cells (300–500 μ l) was seeded on coverslips and placed in 35-mm culture dishes. Electrophysiological experiments were carried out on those cells, usually 2–24 hr after seeding. We used only cultures up to five passages to prevent additional changes due to *in vitro* culture conditions.

RNA isolation

Total RNA from CaC primary cultures was isolated with the NucleoSpin RNA II kit (Clontech). Total RNA was also isolated directly from CaC and NCC biopsies with Trizol reagent (Invitrogen). CaC biopsies used for standard and real-time RT-PCR included three IB1, two IIB and one IIIB, according to FIGO system classification. Commercial total

RNA from human brain and dorsal root ganglia (Clontech) served as positive controls. Total RNA samples were stored at -70°C until analyzed by PCR experiments.

Real-time RT-PCR

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was carried out in a 7300 Real-Time PCR system with the use of Custom TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) for VGSC α - and β -subunits. Primer and probe sequences, the GenBank Accession Numbers of target cDNAs as well as the amplification reaction information are shown in Table 1. Because we have shown that the Na_v1.4 α -subunit is equally expressed in CaC and NCC samples,¹⁴ this was not included in our study. Treated RNA (3 μ g) was reverse transcribed using the High Capacity kit (Applied Biosystems) in 20 μ l of final volume, according to the manufacturer's specifications. Amplification efficiency of each primer pair was evaluated by the standard curve method using serial dilutions of pooled cDNA. Amplification of specific PCR products was detected simultaneously by triplicate in one-assay run, and the Ct (threshold cycle) value for each experimental group was determined. When standard variation was larger than 0.4 among triplicates the assay was performed again. Data normalization was performed by using the Ct from human HPRT1 ($\text{Ct} - \text{Ct HPRT1} = \Delta\text{Ct}$). ΔCt values for CaC samples were then normalized to NCC samples ($\Delta\text{Ct CaC} - \Delta\text{Ct NCC} = \Delta\Delta\text{Ct}$). Finally, $\Delta\Delta\text{Ct}$ values were converted to $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ to calculate the relative expression levels of the target gene.¹⁶ Therefore, data were expressed as an *n*-fold change in gene expression normalized to a reference gene (HPRT1) and relative to NCC samples. Primers and probe for HPRT1 were obtained from TaqMan Endogenous Control from Applied Biosystems, and the amplification efficiency was of 100%. Amplified qPCR fragments were subcloned into the pCR8 vector contained in the GW/TOPO TA Cloning kit (Invitrogen) to further confirm their molecular identity by automated sequencing.

Immunocytochemistry and immunohistochemistry

The immunochemical analysis was performed on the three CaC primary cultures (085, 354 and JP), nine cancerous (four IB1, two IB2, one IIA, one IIB and one IIIB stage) and six NCC biopsies using anti-Na_v1.6 and anti-Na_v1.7 polyclonal rabbit antibodies (Alomone Labs). Primary culture cells were fixed with absolute ethanol, whereas sample biopsies were fixed in a buffered 4% formaldehyde solution, processed as standardized for histology and embedded in paraffin, as reported elsewhere.¹⁷ Briefly, serial sections of 4- μ m thick were mounted on Kling-On charged glass slides (Biocare Medical), deparaffinized using xylene and decreasing series of ethanol. Antigen recuperation was hot induced by immersing slides in 10 mM EDTA solution (pH 8.0) and boiled for 30 min. After blocking endogenous peroxidase activity and nonspecific proteins, slides were incubated with primary antibodies (anti-Na_v1.6 1:150 or anti-Na_v1.7 1:25) during 60 min, followed by 10 min with the secondary antibody (MACH 4 mouse probe) and finally 10 min

Table 1. Real-time PCR primer sequences and amplification summary

Subunit	GenBank accession No.	Primer and probe sequences (5' → 3')	Amplicon size (bp)	Amplification efficiency (%)
Na _v 1.1	AB093548	F: GAGCAATGAGTATAGCCAGCATTCTA	81	95
		R: ACCAACAGGGTGGGCATT		
		P: CTGCCTGGATTCTTCA		
Na _v 1.2	M94055	F: TGGTCATTTCTTGGGCTCATTCT	83	85
		R: GGCCTGATTCTGTTCCTCATAGG		
		P: CCACAGCCAAGATCA		
Na _v 1.3	NM_006922	F: AGACGCAATAGCAAAACAAGCATTT	76	92
		R: CAGCAAAGTCATTTTCAGTCCAACA		
		P: CCGACCTCTGAAACTG		
Na _v 1.6	AY682081	F: GGGATCCATGGAAGTGGTTAGATT	109	92
		R: GCTCGGAGAACCTGAATGTT		
		P: CCCAGGTCCACAACT		
Na _v 1.7a	X82835	F: GCAATGTTTCAGCTCTTCAACTT	74	91
		R: CTTCAGGCCTGGGATTACAGAAATA		
		P: TTTCAAAGCTCTCAACTC		
Na _v 1.7b	JF437648	F: GGGCAATGTCTCAGCGTTGA	83	92
		R: CGATGGTCTTTAGTCTGGAATGAC		
		P: ATGCTCGGAGAACTC		
Na _v β1	NM_001037	F: GGAGGATGAGCGCTTCGA	70	97
		R: CAGATCCTGCAGGCTTTGGT		
		P: CCCC GGCTGCCATT		
Na _v β2	NM_004588	F: TGCAGCCGGAGGATGAG	92	100
		R: GAGGACCTGCAGATGGATCTTG		
		P: CCCCTGACCGCCACCG		
Na _v β3	NM_018400	F: CGCCAGCCCCAGAAGAT	90	96
		R: CACAGGGAAGCAGACTGA		
		P: TTTCCCTGGCTTCTC		
Na _v β4	NM_001142349	F: AAGAAGTGGACAACACAGTGACA	93	100
		R: TGAGTTTCTTGATCAGCAGGATGAG		
		P: ACCCCGCCACGACAG		

F: forward primer; R: reverse primer; P: TaqMan probe. Most probe sequences (except for Na_vβ2 and Na_vβ3) were complementary to antisense DNA strand. JF437648: new sequence reported in our work (see Supporting Information Fig. S2).

with the MACH 4 HRP-polymer. Peroxidase activity was revealed by incubation with 3,3-diaminobenzidine/H₂O₂ (all from Biocare Medical) for 4 min. Sections were contrasted by incubation with hematoxylin (Dako) for 5 min. Immunohistochemical controls were prepared as described above but omitting primary antibodies. Finally, samples were mounted with Entellan permanent resin (Merck) and visualized in a Leica DM750 microscope. Images were taken with the software ImagePro plus v 7.0.1 or the LAS EZ v.1.8.0 from Leica Microsystems.

Migration and invasion *in vitro* assays

Migration assays of CaC cells were performed using transwell migration chambers with 8-μm pore size polycarbonate membrane cell culture inserts (BD Biosciences). The upper

compartment (insert) was seeded with 5×10^4 cells in culture medium plus 5% FBS. The insert was submerged in the lower compartment filled with culture medium enriched with 15% FBS as a chemoattractant. After 72 hr at 37°C, the number of cells in the lower compartment was estimated according to kit's guidelines. Briefly, the noninvading cells that remained in the upper compartment were removed carefully with a swab; cells in the bottom were stained and observed in the microscope. Then, cells were lysed and measured by densitometry at 570 nm with an ELX800 Universal Microplate Reader (Bio-Tek Instruments). To investigate the *in vitro* invasion capacity of CaC cells, we used the QCM™ 24-well collagen-based cell invasion assay with 8-μm pore size (Millipore). To evaluate the effect of VGSC blockers on the

invasion capacity of the cells, the toxins (TTX or Cn2) were added to the upper compartments seeded with 5×10^4 cells. After 72 hr of incubation, the amount of cells in the lower compartment was estimated as mentioned above for migration experiments. Four independent experiments were made in duplicate, and results were normalized to the control condition (*i.e.*, without toxins). To have an estimation of the number of cells that actually migrated or invaded in our assays, we built up standard calibration curves with known number of cells in the same 24-well plates used for the assays. There was a linear relationship between absorbance and number of cells within the range of 1,500–25,000 for 085 and 354 primary culture cells (Supporting Information Fig. S1).

Electrophysiology

General methods for whole-cell patch-clamp recordings of single CaC cells were as specified by Diaz *et al.*¹⁴ and are only summarized here. Recordings were obtained at 21–23°C using the following solutions (in mM): external: 158 NaCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂ and 10 HEPES-NaOH (pH 7.4); internal: 106 CsCl, 30 NaCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 EGTA and 10 HEPES-CsOH (pH 7.3). Because of the low availability of the Cn2, recordings to test its blocking effect on sodium current were performed by local application of the toxin to the recording chamber.

Results

Expression levels of TTX-sensitive VGSC α -subunits in CaC and NCC samples

Automated sequencing of the standard RT-PCR Na_v1.7 transcript (748 bp) from our previous work¹⁴ reveals the presence of two different sequences for this subunit. A BLAST analysis of both sequences showed 100% identity for the first one (named here Na_v1.7a) and 87% identity for the second one (Na_v1.7b, from now on; sequence data were deposited with GenBank under Accession No. JF437648) with the human Na_v1.7 reported sequence (GenBank X82835) (for details of Na_v1.7b sequence, see Supporting Information Fig. S2). Na_v1.7b also shares 90% identity with a splice variant reported in dorsal ganglia (GenBank AY682084) by Raymond *et al.*¹⁸ and 96% with the rat Na_v1.7 sequence (GenBank NM_133289). To determine the relative mRNA levels of each transcript in CaC and NCC biopsies, we designed a specific TaqMan probe for each of them (Table 1), as for Na_v1.1, Na_v1.2, Na_v1.3 and Na_v1.6 subunits.

Transcriptional levels of the six VGSC α -subunits and the reference gene (HPRT1) were determined by qRT-PCR in the three primary cultures of CaC and in six CaC and five NCC biopsies. For comparison of gene transcription levels, Ct values were plotted directly, assuming the same threshold for all genes evaluated. The Ct value is inversely proportional to the amount of RNA template present in the PCR reaction (*i.e.*, the smaller the Ct value the larger the amount of mRNA). Most of analyzed genes in CaC and NCC samples showed Ct values that fall in the moderate expression level category (26–30 cycles), including the reference

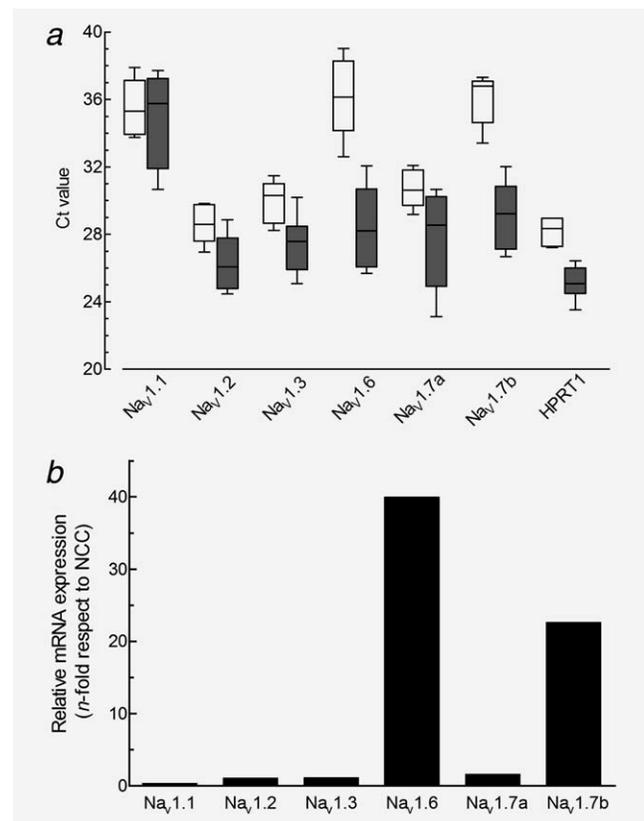


Figure 1. Expression levels of VGSC α -subunits in CaC versus NCC samples. (a) mRNA levels of VGSC α -subunits and HPRT1 genes in CaC and NCC samples. Boxes indicated lower and upper quartiles of cycle thresholds (Ct) range with respective medians, whiskers represent the 10th and 90th percentiles. White boxes, NCC samples ($n = 5$); gray boxes, CaC samples (primary cultures and biopsies; $n = 9$). (b) Expression levels fold changes of VGSC α -subunits genes in CaC versus NCC samples. Bars show the average fold-change ratios ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) of gene expression levels between CaC and NCC samples for the indicated VGSC α -subunits. Na_v1.6 and Na_v1.7b expression levels were clearly upregulated in CaC.

gene HPRT1 (Fig. 1a). It should be noted that even HPRT1 Ct values varied about three cycles (from 28 to 25) between NCC and CaC samples. β -Actin, another reference gene commonly used, showed a larger variation (12 cycles; data not shown), meaning a 1,000-fold increase in CaC samples mRNA levels; therefore, we did not use β -actin as a reference gene. On the other hand, three genes, Na_v1.1, Na_v1.6 and Na_v1.7b, in NCC samples display Ct values between 34 and 38, indicative of very low expressed mRNAs; interestingly, the latter two genes increased importantly their expression in CaC samples. This was not true for Na_v1.1, however.

The mRNA expression of Na_v1.6 and Na_v1.7b is upregulated in CaC

Real-time PCR experiments showed that all VGSC α -subunits investigated are expressed in both NCC and CaC samples

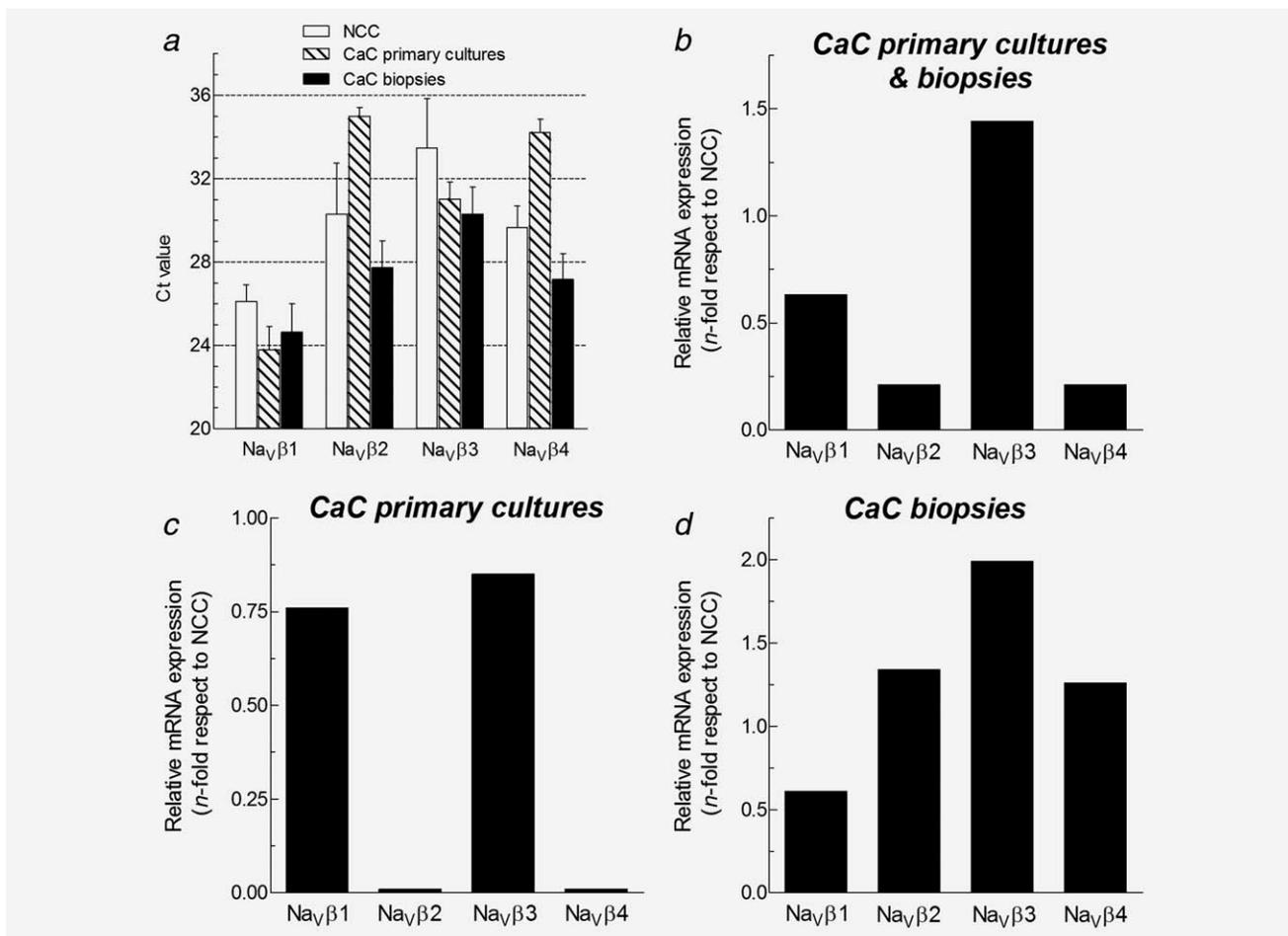


Figure 2. Quantification of VGSC β -subunits mRNA in CaC *versus* NCC by qRT-PCR. (a) Ct values (mean \pm SD) for mRNA levels of Na_V β subunits for NCC biopsies ($n = 5$), CaC biopsies ($n = 6$) and CaC primary cultures ($n = 3$). Same samples used in Figure 1b. Expression levels fold changes of Na_V β subunits genes in CaC *versus* NCC samples (b); CaC primary cultures *versus* NCC biopsies (c) and CaC biopsies *versus* NCC biopsies (d).

(Fig. 1a). The quantitative determinations of mRNA expression showed no substantial changes for Na_V1.1, Na_V1.2, Na_V1.3 and Na_V1.7a between CaC and NCC samples (Fig. 1b). On the contrary, Na_V1.6 and Na_V1.7b mRNAs were specifically overexpressed in CaC samples. Even though there were some differences in Ct values between CaC primary cultures and CaC biopsies, both set of samples followed the tendency to increase the expression levels of Na_V1.6 and Na_V1.7b in CaC samples. On an average, qRT-PCR determinations revealed that relative mRNA expression of Na_V1.6 and Na_V1.7b in CaC samples was 40- and 22-fold higher than in NCC samples, respectively (Fig. 1b). Similar results were obtained when Na_V1.2 or Na_V1.3 subunits were used as reference gene (data not shown).

Differential expression of Na_V β subunits in primary cultures and biopsies from CaC

Because Na_V β subunits have been implicated in process length and cell adhesion in neurons and cancer cells,^{19,20} we investigated the mRNA levels of these subunits in cancerous

and NCC cells. In contrast with the mRNA levels observed for α -subunits, accessory Na_V β subunits showed significantly different tendencies between primary cultures and CaC biopsies, although β 1 was always the most abundant Na_V β subunit (Fig. 2a). On the other hand, Na_V2 and Na_V4 displayed very low levels in CaC primary cultures (Ct \sim 34), but mRNA levels were lower in NCC samples (Ct \sim 30) than in CaC biopsies (Ct \sim 28) (Fig. 2a). In other words, compared with NCC biopsies, the mRNA levels of Na_V2 and Na_V4 were higher in CaC biopsies but they decreased in CaC primary cultures. After normalizing the values with HPRT1 gene, the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ values indicated that only Na_V3 is not overexpressed in CaC samples (Fig. 2b). The comparison between CaC primary cultures and NCC biopsies confirmed the strong downregulation of Na_V2 and Na_V4 in CaC (Fig. 2c). On the contrary, between CaC and NCC biopsies there were no substantial changes in expression, if any, a small increase (less than 100%) in Na_V3 and \sim 50% decrease in Na_V1 (Fig. 2d). A likely explanation for this difference between primary cultures and biopsies from CaC could be

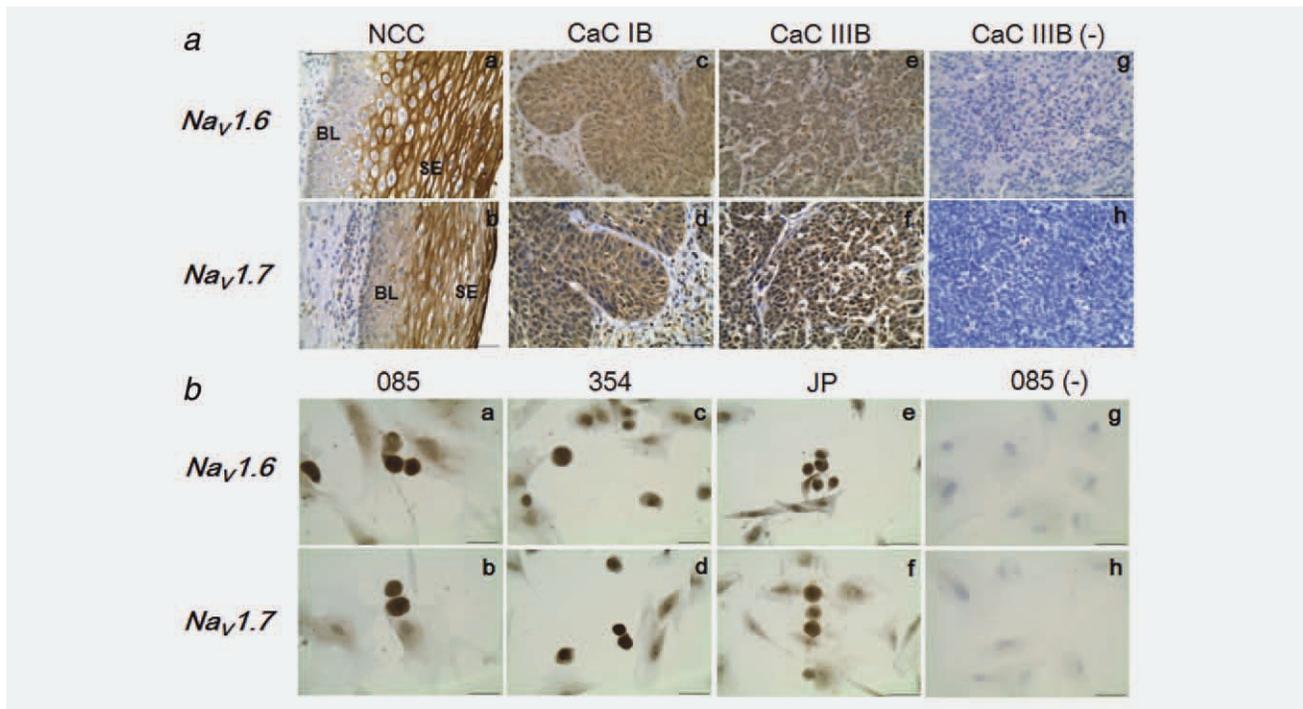


Figure 3. Immunodetection of Na_v1.6 and Na_v1.7 channel proteins in CaC samples. (a) Immunohistochemistry of Na_v1.6 and Na_v1.7 proteins expression in CaC biopsies. Staining of both channels was mainly confined to the plasma membrane of cells from the midzone and superficial zone of the cervical squamous epithelium (SE) in NCC sections (brown staining: *a'* and *b'*); proteins immunoreactivity in basal layer's (BL) cells was weak. On the contrary, the signal for Na_v1.6 channels was widely distributed in the plasma membrane, cytoplasm and nucleus of most cells in CaC biopsies sections from IB (*c'*) and IIIB (*e'*) FIGO stages. The immunolocalization of Na_v1.7 showed a similar pattern than Na_v1.6, although the nucleus staining was not consistent in all sections (*d'* and *f'*). No immunoreactivity was observed when primary antibodies were omitted from the experiments (*g'* and *h'*). Images are representative of nine CaC and six NCC biopsies. (b) Immunocytochemistry of Na_v1.6 and Na_v1.7 proteins expression in CaC cell cultures. Primary cultures (085, 354 and JP) derived from CaC biopsies displayed immunoreactivity for Na_v1.6 (*a'*, *c'* and *e'*) and Na_v1.7 (*b'*, *d'* and *f'*) channels. Again negative controls in the absence of primary antibodies lead to only the hematoxylin counterstain of the cell nucleus (*g'* and *h'*). Bar scale for all images, 50 μm.

related to the assigned adhesion role of Na_vβ subunits,^{20,21} a cell property that might be quite different in biopsies and primary cultures.

Localization of Na_v1.6 and Na_v1.7 channel protein in cervical cancer

Immunochemical staining using specific antibodies against Na_v1.6 and Na_v1.7 demonstrated channel protein expression in NCC ($n = 6$) and CaC ($n = 9$) biopsies sections as well as in CaC primary culture cells ($n = 3$; Fig. 3). Although both channel proteins were detected in all samples, the immunostaining pattern showed two important differences between NCC and CaC samples. First, the localization of Na_v1.6 and Na_v1.7 channel proteins was mostly limited to the plasma membrane of cells from the midzone and superficial zone of the cervical squamous epithelium in NCC sections (Figs. 3*aa'* and 3*ab'*), whereas in CaC (biopsies and primary culture cells) the proteins were widely distributed in the plasma membrane and cytosolic compartments (Figs. 3*ac'*–3*af'* and 3*ba'*–3*bf'*). Second, the immunoreactivity signal was markedly more robust in CaC than NCC samples (compare panels *c'*–*f'*

against *a'*–*b'* of Fig. 3*a*). There were no obvious differences in the staining intensity among the different stages of the CaC biopsies studied. Also, no staining was observed in biopsy sections where primary antibodies were omitted (Figs. 3*ag'*–3*ah'*). Cells from the three primary cultures (085, 354 and JP) also showed strong immunostaining for Na_v1.6 and Na_v1.7 channel proteins (Fig. 3*b*). Thus, the upregulation of Na_v1.6 and Na_v1.7 detected in the mRNA levels (Figs. 1*a* and 1*b*) correlates with a higher relative staining for those channels in cancer tissues compared to noncancerous samples.

Contribution of Na_v1.6 channels to the whole-cell sodium current of CaC cells

To investigate if the upregulation of the mRNA that encodes Na_v1.6 channels and the strong immunoreactivity detected in CaC samples have in fact any functional contribution to the total sodium current of these cells, we performed whole-cell patch-clamp experiments in CaC primary culture cells that we have previously reported for displaying a robust sodium current, the 085 cells.¹⁴ As a pharmacological tool to

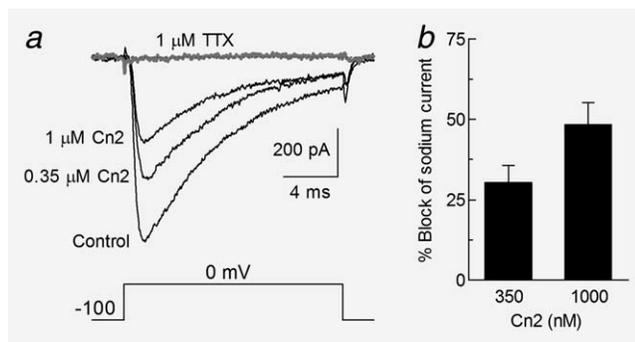


Figure 4. Contribution of $\text{Na}_V1.6$ channels to the sodium current of CaC cells. (a) Representative whole-cell sodium currents recorded at 0 mV in the presence of the indicated concentrations of Cn2, a specific blocker of $\text{Na}_V1.6$, and 1 μM TTX (gray trace) in a cell from the 085 CaC culture cell. (b) Percent block of sodium current by 350 and 1,000 nM Cn2. Bars show the mean \pm SEM ($n = 8$ and 6, respectively).

discriminate the participation of $\text{Na}_V1.6$ channels in the total sodium current, we use the Cn2 toxin, which has been recently reported as a specific blocker of $\text{Na}_V1.6$ channels.^{22,23} Figure 4a shows the block of whole-cell sodium currents recorded at 0 mV from a 085 cell by 350 and 1,000 nM of Cn2 toxin. On an average, 350 nM Cn2 decreased the sodium current amplitude by $30.3\% \pm 5.0\%$ ($n = 8$; Fig. 4b). By increasing the Cn2 concentration to 1 μM , an additional 18% of VGSC activity was blocked ($48.3\% \pm 6.9\%$; $n = 6$; Fig. 4b). We did not use higher Cn2 toxin concentrations to prevent further nonspecific block of sodium channels. When tested, the remaining sodium current was totally blocked with 1 μM TTX (Fig. 5a), confirming our previous reports about the TTX sensitivity nature of the VGSC expressed in these cells.¹⁴ Similar results were observed in 354 cells (data not shown).

Participation of VGSC activity in metastatic cell behaviors

To explore the possibility that the VGSC activity, in general, and $\text{Na}_V1.6$ channels, in particular, could be involved in metastatic behaviors of CaC cells such as migration and invasion, we performed *in vitro* assays in the presence and absence of 6 μM TTX²⁴ or 1 μM Cn2.²³ Proliferation of 085, 354 and JP CaC primary culture cells was not affected after exposure to 6 μM TTX during 72 hr, also that toxin concentration was not toxic for the cells (data not shown). Migration and invasion assays were performed only with two primary cultures, 085 and 354, where the cells of the first generate almost the double of sodium current density than the second (20.4 ± 4.3 , 9.8 ± 2.0 and 11.9 ± 1.6 pA/pF for 085, 354 and JP cells; data from Ref. 14). As shown in Figure 5a, migration was not significantly modified by the presence of TTX or Cn2 in the culture medium in 085 and 354 cells. By contrast, relative invasiveness of these cells was sensitive to both toxins (Fig. 5b). After 72 hr of incubation with 6 μM TTX, relative

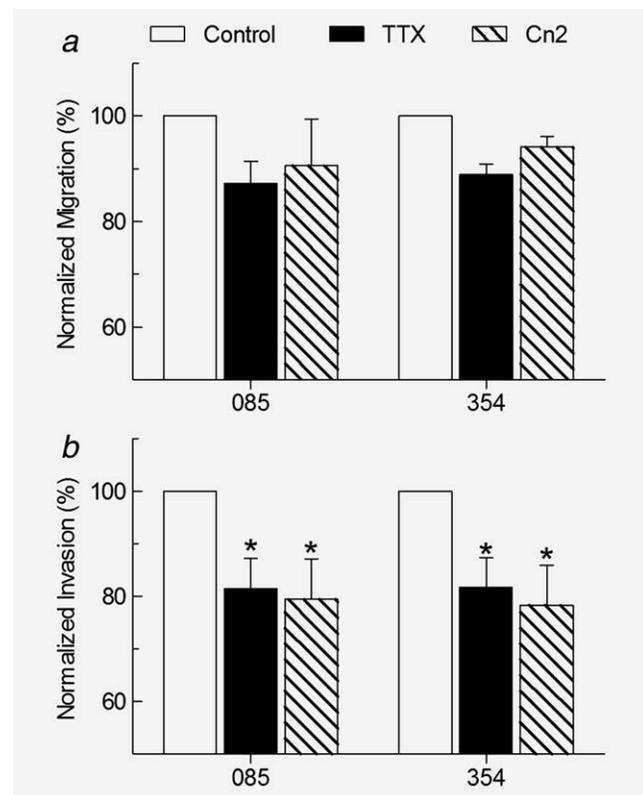


Figure 5. $\text{Na}_V1.6$ contributes to the *in vitro* cell invasiveness of CaC. Relative migration (a) or invasion (b) of CaC cells in the presence of 6 μM TTX or 1 μM Cn2 when compared to control without any toxin. Absorbance values (between 0.6 and 1.2) from both types of assays were normalized to control condition and expressed as percentages. Columns, means from at least three independent experiments; bars, SEM. *Statistically different when comparing control to toxin conditions at $p < 0.001$ (one-way ANOVA, followed by Dunnett's test).

invasion of 085 cells showed a significant decrease when compared to control condition (no toxin; normalized invasion decreased to $81.5\% \pm 5.6\%$). More interestingly, Cn2 toxin (1 μM) had a similar effect on this cell behavior. The same tendency was observed in 354 cells, normalized invasion decreased to $79.5\% \pm 7.6\%$ and $78.3\% \pm 7.6\%$ with TTX and Cn2, respectively. These results suggest that blocking of sodium channels, and particularly $\text{Na}_V1.6$ channels, reduces the relative invasiveness of CaC primary culture cells.

Discussion

Our study shows that mRNA levels of two VGSC α -subunits, $\text{Na}_V1.6$ and $\text{Na}_V1.7b$, were strongly upregulated in biopsies and primary cultures from CaC. Functional expression of both channel proteins was also confirmed, in particular $\text{Na}_V1.6$ subunit contributed to approximately one-third of the sodium current recorded in CaC cells. Specific block of $\text{Na}_V1.6$ channels reduced the *in vitro* invasiveness of these cells. The main implications of such results are that $\text{Na}_V1.6$

could be considered as a novel marker for CaC and also as a potential target for the development of new therapeutic strategies.

Our qRT-PCR results showed that Na_v1.6 mRNA levels were upregulated by 40-fold in CaC samples compared to NCC samples (Fig. 1b). Interestingly, mRNA levels of Na_v1.6 α -subunit were the lowest in NCC samples, together with Na_v1.1 and Na_v1.7b (Fig. 1a); however, only the latter and Na_v1.6 were clearly upregulated in CaC samples (Fig. 1b). On the contrary, mRNA levels for Na_v1.2, Na_v1.3 and Na_v1.7b were moderately expressed in NCC samples and did not show significant changes when compared to CaC samples (Figs. 1a and 1b). Notably, the sequences of Na_v1.6 and Na_v1.7b α -subunits identified in our study correspond to a specific splice isoform of Na_v1.6 (Q9UQD0-2),²⁵ and a Na_v1.7 channel isoform does not correspond to any splice variant reported for human. Because of the observed upregulation of this Na_v1.7 isoform in CaC, it will be important to clone the full sequence of this channel to confirm its functionality and to investigate its biophysical properties.

All the sequenced Na_v1.6 transcripts indicated that it contains the exon 5A, but not the 5N, which have been shown to be developmentally regulated in Na_v1.1 and Na_v1.3 channels^{26,27} as well as in Na_v1.5, whose fetal isoform is abundantly expressed by metastatic breast cancer cells.¹³ However, the 5A isoform (adult isoform) of Na_v1.6 has been shown to be expressed in both fetal and adult brain.^{18,28} It should be noted that Na_v1.1–1.3 and Na_v1.7 are located in chromosome 2q23–24, whereas Na_v1.6 is located alone in chromosome 12q13; therefore, we speculate that chromosomal instability would influence the transcription profile in the CaC cells. This hypothesis is supported by a previous study, where it was shown that the chromosomal abnormalities in prostate cancer cell line DU145 impact the gene expression profile.²⁹

It has been shown that VGSCs are upregulated in several types of cancer cells, including breast, colon, lung, ovary and cancer, and that their functional activity has a relevant contribution in functions linked to invasion, secretion, adhesion and motility.^{7–10,30} Interestingly, Na_v1.5 is the upregulated subunit in most cases, with the exception of prostate cancer (Na_v1.7); however, in CaC the functional activity of Na_v1.5 seems to be almost none, due to the fact that more than 97% of the sodium current was blocked with 1–2 μ M TTX in CaC primary cultures,¹⁴ which indicates the participation of almost exclusively TTX-sensitive sodium channels (Na_v1.5 does not belong to this category). In addition, qRT-PCR results demonstrated that mRNA of neonatal Na_v1.5 isoform is significantly less expressed than the adult Na_v1.5 isoform, and both showed decreased levels of mRNA in CaC samples compared to NCC biopsies (Supporting Information Figs. S3a and S3b). In addition, immunochemical experiments confirmed the absence of Na_v1.5 protein in CaC biopsies (Supporting Information Fig. S3c). Together, these results strongly suggest that the Na_v1.5 role in this type of cancer, if any, has not the same relevance as in others.

By contrast, we demonstrated in our study that Na_v1.6 channel protein is substantially expressed in the plasma membrane and intracellular compartments of CaC primary culture cells as well as in fresh CaC biopsies (Fig. 3); furthermore, the functional activity of Na_v1.6 channel proteins contributes to approximately one-third of the total sodium current recorded from the CaC cells (Fig. 4). It is very likely that the remaining two-thirds of the sodium current could be carried by other TTX-sensitive VGSCs whose mRNA was detected here (*i.e.*, Na_v1.2, Na_v1.3 and Na_v1.7). Thus, our qRT-PCR results showing increased mRNA levels for Na_v1.6 are consistent with the channel protein expression and function observed with immunostaining and patch-clamp experiments. An interesting immunochemical result indicates that Na_v1.6 (and also Na_v1.7) channel protein is widely distributed in membrane and cytoplasmic compartments in CaC samples; on the contrary, in NCC samples the proteins signal is limited to the plasma membrane (Fig. 3). The intracellular expression of Na_v1.6 has been observed in human macrophages, where it is colocalized with vesicles that are distributed throughout the cytoplasm and some of which are associated with the actin cytoskeleton,³¹ participating in the control of podosomes and invadopodia formation, thus suggesting a role for cellular invasion of macrophages.³² Interestingly, we found β -actin mRNA levels augmented around 1,000-fold in CaC samples (data not shown). Changes in cell distribution of Na_v1.6 channels are better exemplified in multiple sclerosis (MS) human patients where the channel is expressed along demyelinated and degenerating axons in MS, instead of being confined to its normal localization in Ranvier's nodes.³³ Interestingly, it was also reported that colocalization of Na_v1.6 channels and the sodium–calcium exchanger (NCX) occurs at sites of axonal injury in the spinal cord in experimental allergic encephalomyelitis.³⁴ Such colocalization might be relevant for a likely mechanism involving Na_v1.6 channels in the metastatic behavior of CaC cells (see below).

Besides their possible role at the intracellular level, Na_v1.6 channels, expressed in the plasma membrane of CaC cells, participate in some metastatic behaviors of this carcinoma. Our observations regarding the block of one-third of the total sodium current in CaC primary cultures cells (Fig. 4), and the decrease in relative invasiveness (Fig. 5) by the action of the Na_v1.6-specific Cn2 toxin, implies the direct participation of the ionic current through Na_v1.6 α -subunit. The contribution of other VGSCs (*i.e.*, Na_v1.1, Na_v1.2, Na_v1.3 and Na_v1.7) to the metastatic behavior seems to be less significant, due to the fact that TTX effect on invasiveness was not different than that observed with the Cn2 toxin (Fig. 5). A positive correlation between sodium current density and relative invasiveness has been observed in breast and prostate cancer, where highly metastatic cell lines express larger sodium currents, compared to poorly metastatic cell lines.^{13,35,36} However, our results in CaC cells were not current density dependent, as both types of CaC cells (085 and 354) were equally affected in their *in vitro* invasiveness behavior by

TTX and Cn2 (Fig. 5). Nevertheless, our results show for the first time the relationship between sodium channel activity and metastatic behavior in primary cultures derived from a primary carcinoma, suggesting that Na_v1.6 channels may play an important functional role in CaC progression.

There is no unanimously accepted mechanism to explain the role of VGSC in the metastatic behavior of some cancer cells, but at least two main roles should be considered: the Na⁺ influx through VGSC α -subunits and the role of VGSC β -subunits as adhesion molecules. The first one includes observations regarding tonic Na⁺ influx through VGSCs,³⁷ inhibition of various basal metastatic cell behaviors by TTX²¹ and diminishing or enhancing of invasiveness by increased Na⁺ concentrations or by the agonist effect of veratridine on VGSCs.³⁸ However, the major criticism of the Na⁺-influx hypothesis is that the transient current through VGSCs may have negligible effect on the global [Na⁺]_i in these cells and any downstream effect is not likely. Nonetheless, generation of local Na⁺ gradients cannot be ruled out.^{39,40} In addition, the implicated participation of NCX driven in reverse mode (Na⁺ export/Ca²⁺ import) observed when [Na⁺]_i is elevated,^{41,42} and in the ionic mechanism of anoxic injury in mammalian axons,^{43,44} with the well-known downstream effects of Ca²⁺,⁴⁵ is in agreement with the specific colocalization of Na_v1.6 channels and the NCX observed in experimental axonal injury.³⁴

Alternatively, the role of VGSCs in metastasis could involve a nonconducting function *via* direct interactions of VGSC β -subunits with other plasma membrane and/or intracellular proteins.^{46,47} For example, VGSC β -subunits (β 1 and β 2) can associate with tenascin-C and tenascin-R (thereby influencing cell migration) and participate in homophilic cell adhesion, resulting in cellular aggregation and ankyrin recruitment.²¹ Importantly, VGSC β -subunits (β 1, β 2 and β 4) are expressed in breast cancer cell lines, where β 1 mRNA and protein levels are significantly higher in the weakly metastatic MCF-7 cell line compared to the highly metastatic MDA-MB-231 cells, consistent with the higher adhesiveness of MCF-7 cells.¹⁹ Furthermore, stable overexpression of β 1 in MDA-MB-231 cells increased the VGSC activity and cell ad-

hesion, but reduced cellular motility, suggesting that the cell adhesive effects of β 1 may be independent of changes in cellular excitability.¹⁹ Finally, a reciprocity of function between β 1 and Na_v1.6 was recently reported in cerebellar granule neurons, where β 1-mediated neurite outgrowth requires Na_v1.6-mediated Na⁺ influx, whereas Na_v1.6 localization and high-frequency firing require β 1.⁴⁸ In our study, we observed that direct blocking of VGSC α -subunits induced a decrease (around 20%) in the invasiveness of CaC primary cultures, if VGSC β -subunits, in particular the high levels of Na_v β 1 detected in CaC samples (Fig. 2a), play an additional role in the metastatic behavior of CaC, it remains to be further investigated. Additionally, the contrasting mRNA levels expressed for Na_v β 2 and Na_v β 4 in CaC primary cultures and CaC biopsies might be implying new roles for these subunits in cell properties related to tumor integrity maintenance.

In conclusion, functional overexpression of Na_v1.6 channels and to a lesser extent Na_v1.7 in CaC might represent the identification of novel molecular markers and potential targets for this carcinoma. Examination of the human ion channel set from a cancer perspective provides important insights into issues relevant to ion channel drug discovery. Thus, our work will provide an opportunity to assess the therapeutic potential of functionally intriguing channels such as VGSCs.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Javier Camacho (Cinvestav) for supplying primary cultures; Dr. Lourival Possani (IBT, UNAM) for providing Cn2 toxin; Dr. Norma Bobadilla (IIB, UNAM) and Dr. Julio Morán (IFC, UNAM) for sharing scientific equipment; Dr. E. Perez Reyes (University of VA) for thoughtful comments of this manuscript and Dr. D.M. Delgadillo for help in the initial proliferation experiments. They also thank L. Ongay-Larios, G. Códiz-Huerta, A.M. Escalante-Gonzalbo, F. Perez-Eugenio and C.E. Diaz-Velasquez at Instituto de Fisiología Celular, UNAM for expert technical assistance. They also thank the Instituto de Ciencia y Tecnología del DF (ICYTDF) and the Dirección General de Asuntos del Personal Académico of the Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM) for research funding support to JC Gomora. E. Hernandez-Plata is a fellow of the ICYTDF and a student of the Ph.D. Program in Biochemical Sciences at the UNAM.

References

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127:2893–917.
2. Roden R, Wu TC. How will HPV vaccines affect cervical cancer? *Nat Rev Cancer* 2006;6:753–63.
3. Bauch CT, Li M, Chapman G, Galvani AP. Adherence to cervical screening in the era of human papillomavirus vaccination: how low is too low? *Lancet Infect Dis* 2010;10:133–7.
4. Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends Mol Med* 2010;16:107–21.
5. Fraser SP, Pardo LA. Ion channels: functional expression and therapeutic potential in cancer. Colloquium on ion channels and cancer. *EMBO Rep* 2008;9:512–15.
6. Diss JK, Stewart D, Pani F, Foster CS, Walker MM, Patel A, Djamgoz MB. A potential novel marker for human prostate cancer: voltage-gated sodium channel expression in vivo. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2005;8:266–73.
7. Gao R, Shen Y, Cai J, Lei M, Wang Z. Expression of voltage-gated sodium channel alpha subunit in human ovarian cancer. *Oncol Rep* 2010;23:1293–9.
8. Chioni AM, Shao D, Grose R, Djamgoz MB. Protein kinase A and regulation of neonatal Nav1.5 expression in human breast cancer cells: activity-dependent positive feedback and cellular migration. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42:346–58.
9. Roger S, Rollin J, Barascu A, Besson P, Raynal PI, Iochmann S, Lei M, Bougnoux P, Gruel Y, Le Guennec JY. Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:774–86.
10. House CD, Vaske CJ, Schwartz AM, Obias V, Frank B, Luu T, Sarvazyan N, Irby R,

- Strausberg RL, Hales TG, Stuart JM, Lee NH. Voltage-gated Na⁺ channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion. *Cancer Res* 2010;70:6957–67.
11. Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000;26:13–25.
 12. Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 2005;57:397–409.
 13. Fraser SP, Diss JK, Chioni AM, Mycielska ME, Pan H, Yamaci RF, Pani F, Siwy Z, Krasowska M, Grzywna Z, Brackenbury WJ, Theodorou D, et al. Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 2005;11:5381–9.
 14. Diaz D, Delgado DM, Hernandez-Gallegos E, Ramirez-Dominguez ME, Hinojosa LM, Ortiz CS, Berumen J, Camacho J, Gomora JC. Functional expression of voltage-gated sodium channels in primary cultures of human cervical cancer. *J Cell Physiol* 2007;210:469–78.
 15. Farias LM, Ocana DB, Diaz L, Larrea F, Avila-Chavez E, Cadena A, Hinojosa LM, Lara G, Villanueva LA, Vargas C, Hernandez-Gallegos E, Camacho-Arroyo I, et al. Ether a-go-go potassium channels as human cervical cancer markers. *Cancer Res* 2004;64:6996–7001.
 16. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402–8.
 17. Diaz L, Ceja-Ochoa I, Restrepo-Angulo I, Larrea F, Avila-Chavez E, Garcia-Becerra R, Borja-Cacho E, Barrera D, Ahumada E, Gariglio P, Alvarez-Rios E, Ocádiz-Delgado R, et al. Estrogens and human papilloma virus oncogenes regulate human ether-a-go-go-1 potassium channel expression. *Cancer Res* 2009;69:3300–7.
 18. Raymond CK, Castle J, Garrett-Engle P, Armour CD, Kan Z, Tsinoremas N, Johnson JM. Expression of alternatively spliced sodium channel alpha-subunit genes. Unique splicing patterns are observed in dorsal root ganglia. *J Biol Chem* 2004;279:46234–41.
 19. Chioni AM, Brackenbury WJ, Calhoun JD, Isom LL, Djamgoz MB. A novel adhesion molecule in human breast cancer cells: voltage-gated Na⁺ channel beta1 subunit. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:1216–27.
 20. Brackenbury WJ, Davis TH, Chen C, Slat EA, Detrow MJ, Dickendeshier TL, Ranscht B, Isom LL. Voltage-gated Na⁺ channel beta1 subunit-mediated neurite outgrowth requires Fyn kinase and contributes to postnatal CNS development in vivo. *J Neurosci* 2008;28:3246–56.
 21. Brackenbury WJ, Djamgoz MB, Isom LL. An emerging role for voltage-gated Na⁺ channels in cellular migration: regulation of central nervous system development and potentiation of invasive cancers. *Neuroscientist* 2008;14:571–83.
 22. de la Vega RC, Possani LD. Novel paradigms on scorpion toxins that affects the activating mechanism of sodium channels. *Toxicon* 2007;49:171–80.
 23. Schiavon E, Sacco T, Cassulini RR, Gurrola G, Tempia F, Possani LD, Wanke E. Resurgent current and voltage sensor trapping enhanced activation by a beta-scorpion toxin solely in Nav1.6 channel. Significance in mice Purkinje neurons. *J Biol Chem* 2006;281:20326–37.
 24. Fraser SP, Ding Y, Liu A, Foster CS, Djamgoz MB. Tetrodotoxin suppresses morphological enhancement of the metastatic MAT-LyLu rat prostate cancer cell line. *Cell Tissue Res* 1999;295:505–12.
 25. Plummer NW, McBurney MW, Meisler MH. Alternative splicing of the sodium channel SCN8A predicts a truncated two-domain protein in fetal brain and non-neuronal cells. *J Biol Chem* 1997;272:24008–15.
 26. Sarao R, Gupta SK, Auld VJ, Dunn RJ. Developmentally regulated alternative RNA splicing of rat brain sodium channel mRNAs. *Nucleic Acids Res* 1991;19:5673–9.
 27. Gustafson TA, Clevinger EC, O'Neill TJ, Yarowsky PJ, Krueger BK. Mutually exclusive exon splicing of type III brain sodium channel alpha subunit RNA generates developmentally regulated isoforms in rat brain. *J Biol Chem* 1993;268:18648–53.
 28. Gazina EV, Richards KL, Mokhtar MB, Thomas EA, Reid CA, Petrou S. Differential expression of exon 5 splice variants of sodium channel alpha subunit mRNAs in the developing mouse brain. *Neuroscience* 2010;166:195–200.
 29. Chaudhary J, Schmidt M. The impact of genomic alterations on the transcriptome: a prostate cancer cell line case study. *Chromosome Res* 2006;14:567–86.
 30. Ding Y, Brackenbury WJ, Onganer PU, Montano X, Porter LM, Bates LF, Djamgoz MB. Epidermal growth factor upregulates motility of Mat-LyLu rat prostate cancer cells partially via voltage-gated Na⁺ channel activity. *J Cell Physiol* 2008;215:77–81.
 31. Carrithers MD, Dib-Hajj S, Carrithers LM, Tokmouline G, Pypaert M, Jonas EA, Waxman SG. Expression of the voltage-gated sodium channel Nav1.5 in the macrophage late endosome regulates endosomal acidification. *J Immunol* 2007;178:7822–32.
 32. Carrithers MD, Chatterjee G, Carrithers LM, Offoha R, Iheagwara U, Rahner C, Graham M, Waxman SG. Regulation of podosome formation in macrophages by a splice variant of the sodium channel SCN8A. *J Biol Chem* 2009;284:8114–26.
 33. Craner MJ, Newcombe J, Black JA, Hartle C, Cuzner ML, Waxman SG. Molecular changes in neurons in multiple sclerosis: altered axonal expression of Nav1.2 and Nav1.6 sodium channels and Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:8168–73.
 34. Craner MJ, Hains BC, Lo AC, Black JA, Waxman SG. Co-localization of sodium channel Nav1.6 and the sodium-calcium exchanger at sites of axonal injury in the spinal cord in EAE. *Brain* 2004;127:294–303.
 35. Grimes JA, Fraser SP, Stephens GJ, Downing JE, Laniado ME, Foster CS, Abel PD, Djamgoz MB. Differential expression of voltage-activated Na⁺ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro. *FEBS Lett* 1995;369:290–4.
 36. Laniado ME, Lalani EN, Fraser SP, Grimes JA, Bhargal G, Djamgoz MB, Abel PD. Expression and functional analysis of voltage-activated Na⁺ channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion in vitro. *Am J Pathol* 1997;150:1213–21.
 37. Roger S, Besson P, Le Guennec JY. Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. *Biochim Biophys Acta* 2003;1616:107–11.
 38. Gillet L, Roger S, Besson P, Lecaille F, Gore J, Bougnoux P, Lalmanach G, Le Guennec JY. Voltage-gated sodium channel activity promotes cysteine cathepsin-dependent invasiveness and colony growth of human cancer cells. *J Biol Chem* 2009;284:8680–91.
 39. Bennay M, Langer J, Meier SD, Kafitz KW, Rose CR. Sodium signals in cerebellar Purkinje neurons and Bergmann glial cells evoked by glutamatergic synaptic transmission. *Glia* 2008;56:1138–49.
 40. Nikolaeva MA, Mukherjee B, Stys PK. Na⁺-dependent sources of intra-axonal Ca²⁺ release in rat optic nerve during in vitro chemical ischemia. *J Neurosci* 2005;25:9960–7.
 41. Piacentino V, III, Weber CR, Gaughan JP, Margulies KB, Bers DM, Houser SR. Modulation of contractility in failing human myocytes by reverse-mode Na/Ca exchange. *Ann N Y Acad Sci* 2002;976:466–71.
 42. Weisser-Thomas J, Piacentino V, III, Gaughan JP, Margulies K, Houser SR.

- Calcium entry via Na/Ca exchange during the action potential directly contributes to contraction of failing human ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 2003;57:974–85.
43. Waxman SG, Black JA, Stys PK, Ransom BR. Ultrastructural concomitants of anoxic injury and early post-anoxic recovery in rat optic nerve. *Brain Res* 1992;574:105–19.
44. Stys PK, Waxman SG, Ransom BR. Ionic mechanisms of anoxic injury in mammalian CNS white matter: role of Na⁺ channels and Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *J Neurosci* 1992;12:430–9.
45. Mycielska ME, Fraser SP, Szatkowski M, Djamgoz MB. Contribution of functional voltage-gated Na⁺ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer. II. Secretory membrane activity. *J Cell Physiol* 2003;195:461–9.
46. Diss JK, Fraser SP, Djamgoz MB. Voltage-gated Na⁺ channels: multiplicity of expression, plasticity, functional implications and pathophysiological aspects. *Eur Biophys J* 2004;33:180–93.
47. Diss JK, Fraser SP, Walker MM, Patel A, Latchman DS, Djamgoz MB. Beta-subunits of voltage-gated sodium channels in human prostate cancer: quantitative in vitro and in vivo analyses of mRNA expression. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2008;11:325–33.
48. Brackenbury WJ, Calhoun JD, Chen C, Miyazaki H, Nukina N, Oyama F, Ranscht B, Isom LL. Functional reciprocity between Na⁺ channel Nav1.6 and beta1 subunits in the coordinated regulation of excitability and neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:2283–8.

Papel de los canales de sodio activados por voltaje en la capacidad metastásica de las células cancerosas

Everardo Hernández-Plata*

* Departamento de Neuropatología Molecular, División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

Role of the voltage-gated sodium channels in the metastatic capacity of cancer cells

ABSTRACT

The functional expression of voltage-gated sodium channels (Na_v) in cancer cells is associated with an increase of metastatic potential. The activity of Na_v channels modulates different cellular processes related to the development of the malignant phenotype, such as adhesion, galvanotaxis, motility and invasiveness. Among the great diversity of cancerous phenotypes, Na_v channels expression is common in highly metastatic cells with their distribution following a primary tumor-specific pattern. The purpose of this paper is to review the literature, regarding to: the types of Na_v channels expressed by different types of cancer cells, the cancer cellular processes in which they play important roles, and the molecular mechanisms by which these channels promote metastasis.

Key words. Voltage-gated sodium channels. Na_v . Molecular marker. Metastasis. Cancer. Therapeutic target.

RESUMEN

La expresión funcional de canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v) en células cancerosas está asociada al incremento de la capacidad metastásica. La actividad de los canales Na_v modula distintos procesos celulares relacionados con el desarrollo del fenotipo maligno, tales como la adhesión, galvanotaxis, movilidad e invasividad. Dentro de la gran diversidad de fenotipos cancerosos la expresión de canales Na_v es común dentro de las células altamente metastásicas; sin embargo, el tipo particular del canal expresado parece depender del tejido en el que se genera el tumor primario. El propósito de este artículo es revisar la literatura sobre los canales Na_v expresados en distintos tipos de cáncer, los procesos celulares en los que participan y los mecanismos moleculares por los cuales promueven metástasis.

Palabras clave. Canales de sodio activado por voltaje. Na_v . Marcador molecular. Metástasis. Cáncer. Blanco terapéutico.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad potencialmente fatal causada por factores genéticos y ambientales, que representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial.¹ Las características fisiopatológicas del cáncer varían de acuerdo con el órgano o tejido afectado; sin embargo, se han identificado seis características comunes que comparten las células cancerosas:²

- Autosuficiencia de señales de crecimiento.
- Insensibilidad a la señales de paro de la progresión del ciclo celular.

- Evasión de la apoptosis.
- Replicación ilimitada.
- Capacidad angiogénica.
- Invasión de tejidos y metástasis.

La progresión a través de las etapas del ciclo celular es controlada por la expresión génica, la activación de vías de señalización y la regulación del volumen celular. Estos procesos son modulados por múltiples factores, dentro de los cuales la concentración intracelular de iones resulta crucial, y ésta a su vez depende de la expresión de canales y transportadores iónicos. En los procesos oncológicos estas proteínas son expresadas

de manera anómala;³⁻⁵ revisiones previas han intentado explicar la conexión existente entre ellas para orquestar el establecimiento y desarrollo del fenotipo maligno.⁶⁻¹¹

Dentro de la gran diversidad de canales y transportadores iónicos, la expresión funcional de canales de sodio activados por voltaje (canales Na_v) confiere a la células cancerosas un mayor potencial metastásico.¹²⁻¹⁴ Los canales Na_v son proteínas transmembranales que se expresan generalmente en células excitables como neuronas, células secretoras y mioцитos. La función más conocida de los canales Na_v es su participación en la generación y propagación de impulsos eléctricos conocidos como potenciales de acción mediante los cuales se transmite la información entre células.¹⁵ Los canales Na_v son en realidad complejos multiproteicos constituidos por una subunidad principal α (~260 kDa) que forma el poro por donde transitan los iones sodio en respuesta a despolarizaciones del potencial de membrana y una o dos subunidades auxiliares β (~40 kDa), cuya función clásica consiste en modular el tráfico y las propiedades biofísicas de la subunidad principal.¹⁶ La subunidad α es una proteína formada por cuatro

dominios homólogos y cada dominio consiste de seis segmentos transmembranales (S1 a S6) unidos por asas intra y extracelulares (Figura 1). Hasta el momento funcionalmente se han caracterizado nueve subunidades α (Na_v1.1-Na_v1.9), cada una codificada por un gen distinto (*SCN1A-SCN5A*, *SCN8A-SCN11A*), clasificadas por su homología¹⁷ y sensibilidad a la tetrodotoxina (TTX). Las subunidades Na_v1.1-Na_v1.4, Na_v1.6 y Na_v1.7 son consideradas sensibles a la TTX, ya que la IC₅₀ de la toxina requerida para bloquear su actividad se encuentra en el rango nanomolar; mientras que las subunidades Na_v1.5, Na_v1.8 y Na_v1.9 son resistentes a la TTX, ya que se requieren concentraciones micromolares para bloquearlas.¹⁵

A la fecha se conocen cuatro genes que codifican para subunidades auxiliares β de canales de sodio: Na_vβ1 a Na_vβ4.^{18,19} Las subunidades β tienen un solo segmento transmembranal y un extremo amino extracelular prominente con el cual, además de modular la actividad de la subunidad α, pueden interactuar con otras proteínas y establecer complejos de adhesión con células adyacentes y con la matriz extracelular.^{16,20}

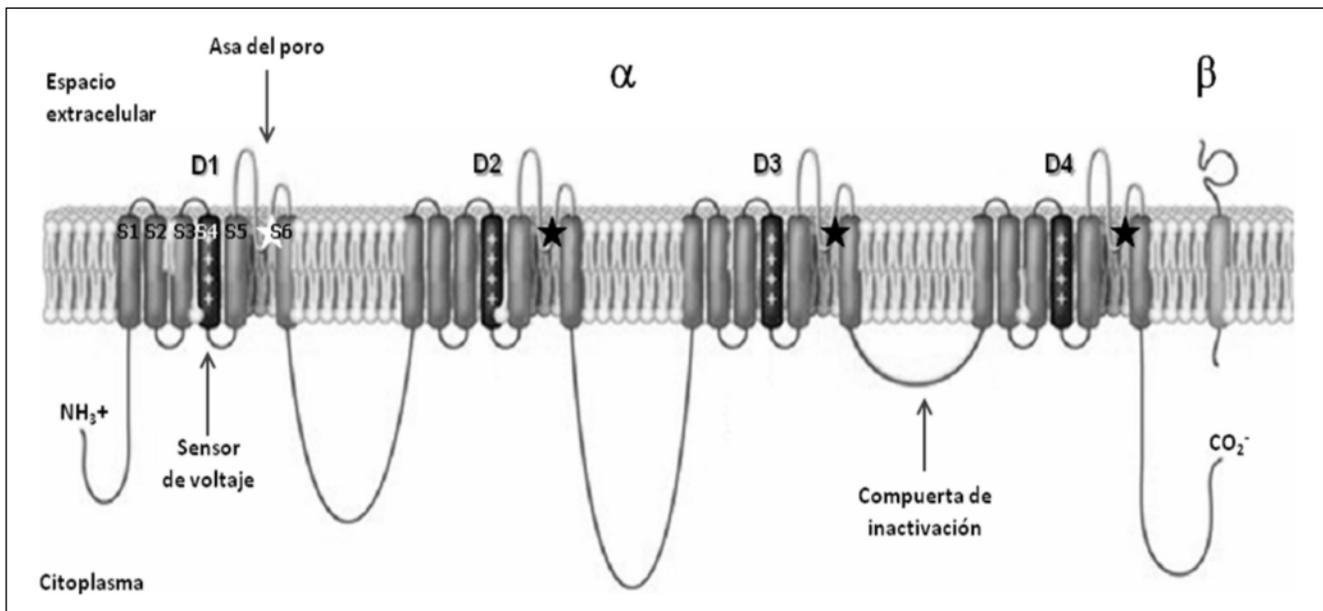


Figura 1. Esquema de los elementos estructurales de un canal de sodio activado por voltaje. La subunidad α está constituida por cuatro dominios homólogos interconectados por asas intracelulares. Cada dominio consta de seis segmentos transmembranales (S1 a S6), de los cuales el S4 se caracteriza por contener varios aminoácidos cargados positivamente, y funciona como sensor de voltaje. En respuesta a la despolarización membranar, el movimiento del sensor de voltaje ocasiona un cambio conformacional de la proteína que culmina en la apertura del poro conductor de los iones. También se muestra la compuerta de inactivación del canal, localizada en el asa que une los dominios 3 y 4; así como los sitios de unión para la TTX (★, en las asas que unen a los segmentos 5 y 6 de cada dominio), localizados en las asas del poro.^{15,16} Además, se ilustra una de las subunidades auxiliares β que modula la expresión membranar y las propiedades biofísicas de la subunidad α; otra de sus funciones consiste en establecer uniones con proteínas de matriz extracelular o células adyacentes.^{15,18,20}

EXPRESIÓN DE CANALES Na_v EN CÉLULAS CANCEROSAS

Las células que cursan por procesos oncológicos contienen una mayor concentración citoplasmática de sodio con respecto a sus homólogas sanas, como en el caso de las células no pequeñas de pulmón²¹, hepatomas, adenocarcinomas mamaros,²² oligodendrogliomas y astrocitomas,²³ lo cual se refleja en una tendencia a presentar un potencial de membrana más positivo (despolarizado) que en condiciones no cancerosas.^{13,21,24} Además de contribuir al incremento en la concentración intracelular de sodio, la expresión de canales Na_v promueve una alta movilidad e invasividad celular que resulta en un incremento del potencial metastásico de las células cancerosas, mediante mecanismos que comienzan a ser estudiados y que se discuten a continuación.

En 1995 se publicó el primer reporte en el que se relacionó la expresión funcional de canales Na_v con una alta capacidad invasiva de las células cancerosas.²⁵ En este trabajo se compararon dos líneas celulares de cáncer de próstata de rata: AT2 y Mat-Ly-Lu, caracterizándose esta última por expres

sar canales Na_v y presentar un alto potencial metastásico. Más tarde se encontró la misma relación positiva entre la expresión membranal de canales Na_v y un alto potencial invasivo de distintas líneas celulares de cáncer de próstata de rata y de humano.²⁶ En estos estudios se mostró que los canales Na_v expresados en células de cáncer de próstata eran sensibles a la TTX, y en un estudio posterior se determinó que Na_v1.7 es la subunidad más abundante en este tipo de cáncer.²⁷

En las células de cáncer de mama altamente metastásicas también se expresan canales Na_v funcionales. En 2003 se describió la expresión de una corriente de sodio activada por voltaje en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.²⁴ Dicha corriente presentó resistencia al bloqueo por TTX (IC₅₀ = 1.78 ± 0.22 μM; bloqueo total = 30 μM), así como cinéticas similares a las reportadas para el canal de sodio expresado en el corazón, por lo que los autores postularon a la subunidad Na_v1.5 como el potencial sustrato molecular para el transporte de la corriente de sodio registrada. Sin embargo, en el artículo referido no se realizaron estudios de biología molecular para identificar al canal Na_v expresado. En un estudio posterior,

Cuadro 1. Principales subunidades de canales Na_v expresadas en diferentes tipos de cáncer.

Subunidad	Tipo de cáncer	RNA	Proteína	Registro de corriente	Líneas celulares	Biopsias	Referencia	
Na _v 1.5	Colon	✓		✓		✓	29	
	Leucemia	✓	✓		✓	-	28	
	Mama		-	-	✓	✓	-	24
			✓	✓		✓	✓	13
	Mesotelioma	✓	-	✓	✓	✓	40	
	Neuroblastoma	✓	-	✓	✓	-	56	
	Ovario	✓	✓	-	✓	✓	57	
Pulmón	✓	✓	✓	✓	✓	21		
Na _v 1.6	Cérvix uterino	✓	✓	✓	-	✓	30	
		✓	-	✓	-	✓	31	
Na _v 1.7	Próstata	-	-	✓	✓	-	25	
		✓	-	-	✓	-	27	
		✓	✓	-	✓	✓	58	
Na _v β1	Cérvix uterino	✓	-	-	-	✓	30	
	Colon	✓	-	-	✓	-	20	
	Mama	✓	✓	-	✓	-	33	
	Próstata	✓	-	-	✓	✓	59	
	Pulmón	✓	-	-	✓	-	21	

EFFECTO DE LA EXPRESIÓN DE LOS CANALES Na_V EN LA BIOLOGÍA DE LA CÉLULA CANCEROSA

Adhesión

Fraser, *et al.*¹³ comprobaron que el canal Na_V sobre-expresado en el cáncer de mama es $Na_V1.5$, tanto en líneas celulares altamente metastásicas (MDA-MB-231) como en biopsias de pacientes con metástasis en nódulos linfáticos. El canal $Na_V1.5$ expresado en estas muestras corresponde a la isoforma neonatal generada por procesamiento alternativo del mRNA, que difiere de la isoforma adulta en la sustitución de siete aminoácidos comprendidos entre el segmento S3 y S4 del dominio I de la subunidad α del canal. En el mismo trabajo también se analizó la expresión de corrientes de sodio activadas por voltaje en líneas celulares de cáncer de mama con pobre o nulo comportamiento metastásico, los resultados mostraron que dichas células no expresan corrientes de sodio, lo que reforzó la evidencia sobre la relación positiva entre la expresión de canales Na_V y una alta capacidad invasiva de las células cancerosas. Esta hipótesis ha sido comprobada por distintos grupos de investigación en otros tipos de cáncer como leucemia,²⁸ pulmón,²¹ colon,²⁹ próstata¹⁴ y cérvix uterino.³⁰ Adicionalmente, en un estudio en el que se transfectó el canal $Na_V1.4$ en células de cáncer de próstata con distintos potenciales metastásicos se evidenció un incremento de la capacidad invasiva en todas ellas.¹²

Nuestros propios estudios sobre la expresión de canales iónicos activados por voltaje en cáncer cervicouterino (CaCu) han mostrado la expresión de canales Na_V sensibles a la TTX;³¹ a diferencia de otros tipos de cáncer, en el CaCu la subunidad que incrementa en mayor grado su expresión con respecto al tejido no canceroso es $Na_V1.6$, y el bloqueo específico de su actividad disminuye la capacidad invasiva de las células cancerosas, hecho que coloca a esta subunidad como un marcador molecular característico y un potencial blanco terapéutico de este cáncer.³⁰ Estas observaciones, así como una relación de los tipos de cáncer en los que se ha reportado la sobre-expresión de canales Na_V , se presentan de manera resumida en el cuadro 1.

Estas evidencias indican que la sobre-expresión de los canales Na_V es necesaria y suficiente para incrementar el potencial metastásico de células cancerosas y un número creciente de publicaciones busca determinar las propiedades de la célula cancerosa que son influenciadas por los canales Na_V , así como los mecanismos moleculares mediante los cuales estos canales ejercen su efecto sobre la potenciación de la invasividad. A continuación se describen los principales procesos de la célula cancerosa en los que se ha encontrado la participación de los canales Na_V .

La transformación hacia el fenotipo invasivo implica desregulación de la adhesión que la célula cancerosa mantiene con células adyacentes y con moléculas de la matriz extracelular; en este proceso, las moléculas de adhesión pueden regular vías de señalización que promueven la progresión del fenotipo canceroso. La expresión funcional de canales Na_V se ha relacionado con la disminución de la fuerza con la que las células cancerosas se adhieren a su sustrato. Palmer, *et al.*³² desarrollaron un sistema para medir con cierta precisión la fuerza con la que una célula se adhiere a la matriz extracelular: SCAMA (*Single Cell Adhesion Measuring Apparatus*). Con este sistema se mostró que las células cancerosas con un alto potencial metastásico se adhieren más débilmente al sustrato que aquéllas que presentan un potencial invasivo bajo o nulo. En este mismo trabajo, y en otros posteriores, se demostró que el bloqueo de la actividad de los canales Na_V con TTX aumenta la fuerza de adhesión de las células altamente metastásicas,^{14,33,34} lo que indica que además de la estructura, la actividad de los canales es responsable de la modulación de la fuerza de interacción entre la célula cancerosa y el medio extracelular.

En un estudio reciente se mostró que los canales $Na_V1.5$ promueven la formación de colonias celulares de cáncer de mama, lo cual se previene al bloquear su actividad con TTX, sugiriendo que la expresión funcional de estos canales facilita la adhesión con células adyacentes.³⁵ A la fecha no se han determinado los sustratos moleculares responsables de este fenómeno, y se debe considerar que en el cáncer de mama hay expresión de subunidades β que pueden aumentar la fuerza de adhesión, desempeñando el papel de moléculas de adhesión celular (CAM).^{20,33,36} Asimismo, los canales Na_V pueden regular la expresión de otras CAMs, como los miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas L1 y N-CA; N-Caderina y CAMs dependientes de calcio, como ocurre en el desarrollo del sistema nervioso.³⁷ La participación de las subunidades β en la capacidad invasiva del fenotipo canceroso se revisará más adelante.

Movilidad

Al disminuir la fuerza con la que se adhieren las células cancerosas a su sustrato resulta evidente

que la expresión funcional de los canales Na_v se encuentra vinculada con el aumento de la movilidad de las células cancerosas. Esta hipótesis fue probada en células de cáncer de próstata altamente metastásicas, en las que el bloqueo de la actividad de los canales Na_v produjo una disminución de la movilización celular; mientras que su apertura la incrementó.³⁸ El mismo fenómeno se ha observado en líneas celulares de cáncer de mama³⁹ y en cultivos primarios de mesotelioma.⁴⁰

La forma en la que se vinculan ambos fenómenos aún no es clara por completo, pero varios procesos celulares parecen estar involucrados. Los canales Na_v expresados en la membrana son acompañados de subunidades reguladoras β que pueden modular la remodelación estructural del citoesqueleto en respuesta a la presencia de moléculas extracelulares como las tenasinas C y R.^{20,36} Asimismo, la actividad de los canales Na_v modifica el gradiente intracelular de iones, y puede generar un aumento focalizado de la concentración citoplasmática de calcio, mediante mecanismos que se discuten más adelante, y así activar a otras proteínas y canales iónicos, como los de potasio, que participan en la remodelación del citoesqueleto y en la movilidad celular.⁴¹

Galvanotaxis

La galvanotaxis es la movilización celular direccionada en respuesta a un campo eléctrico.⁴² En condiciones fisiológicas los campos eléctricos pueden manifestarse en forma de potenciales neuronales (potenciales de acción) o en forma de potenciales epiteliales transcelulares que son claramente distinguibles en las glándulas, dado su revestimiento con células epiteliales. La galvanotaxis tiene una gran relevancia en la embriogénesis, la regeneración tisular y la metástasis;^{43,44} controla, además, la remodelación del citoesqueleto mediante la promoción de la polimerización de túbulos de actina en la dirección en que la célula dirige su movimiento y regula la formación y ruptura de uniones entre la célula y la matriz extracelular a través del flujo intracelular direccionado de calcio.⁴⁵

Las evidencias experimentales sobre la respuesta galvanotáctica de las células cancerosas iniciaron con un reporte en el que Djamgoz, *et al.*⁴² mostraron que las células cancerosas de próstata responden a campos eléctricos exógenos, y que el sodio transportado por los canales Na_v regula esa respuesta celular. En ese estudio las líneas celulares Mat-Ly-Lu y AT-2 fueron sometidas a un campo eléctrico de fuerza fisiológica (0.1-4.0 Vcm⁻¹), y sola-

mente las células MAT-Ly-Lu respondieron al estímulo, migrando hacia el cátodo. Asimismo, la apertura de los canales Na_v , con veratridina, condujo al incremento de la respuesta galvanotáctica, lo cual fue revertido al incubarse a las células con TTX.

Estas observaciones sugirieron que los canales Na_v modulaban la galvanotaxis en las células cancerosas altamente metastásicas, lo cual se corroboró al estudiar este fenómeno con líneas celulares de otros tipos de cáncer. Contrario a lo observado en el cáncer de próstata⁴² y de pulmón,⁴⁵ las células de cáncer de mama (MDA-MB-231) migran hacia el ánodo al ser expuestas a un campo eléctrico.^{13,46} Aunque este comportamiento también se ha reportado para otros tipos celulares, los mecanismos moleculares que determinan la polaridad del movimiento celular aun no se han identificado.

Algunas hipótesis que explican la relación entre los canales Na_v y la galvanotaxis plantean que como consecuencia de su actividad se pueden generar incrementos localizados en la concentración intracelular de calcio, mediados por la actividad de transportadores membranales,^{47,48} o por la liberación de pozas intracelulares.⁴⁹ El calcio libre podría activar a la proteína-quinasa A (PKA) y de esta manera modular la fosforilación de componentes del citoesqueleto para modificar su estructura. Por otro lado, los canales Na_v provocarían directamente cambios conformacionales de la célula al interactuar físicamente con el citoesqueleto.²⁰

Exocitosis

El estudio de la capacidad de endocitosis-exocitosis de líneas celulares con diferentes potenciales metastásicos ha reflejado que aquéllas con un alto potencial invasivo presentan una mayor actividad endocítica-exocítica. Mycielska, *et al.*⁵⁰ mostraron que el bloqueo de los canales Na_v con TTX conduce a una disminución de la capacidad endocítica de las células altamente metastásicas (Mat-Ly-Lu); mientras que no ejerce el mismo efecto sobre las células no invasivas. Una misma tendencia se observó al estudiar las células de cáncer de mama MDA-MB-231, comparándolas con las MCF-7 de bajo potencial metastásico, en donde además la apertura de los canales Na_v con aconitina produjo un aumento de la endocitosis.¹³ Estos experimentos indican que los canales Na_v regulan positivamente la actividad secretora de las células cancerosas altamente metastásicas.

Asimismo, se ha mostrado que la concentración intracelular de sodio es importante para regular la

actividad secretora de algunas neuronas.⁵¹ Los mecanismos por los cuales la expresión funcional de canales Na_v promueve la exocitosis involucran el aumento en la concentración intracelular de sodio, así como la acidificación del pH perimembranal extracelular y la basificación del pH intracelular, lo cual es logrado a través de la modificación del funcionamiento de transportadores membranales Na^+/H^+ ,⁵² que lleva a la liberación de calcio de posas intracelulares y concluye con la modificación del tráfico vesicular mediante la activación de cinasas (PKC o CaM II) y la fosforilación de elementos del citoesqueleto de actina.

Regulación del pH perimembranal

Recientemente se han analizado las implicaciones patológicas de un entorno extracelular ácido en tumores comparado con las condiciones fisiológicas del tejido en el que se desarrollan; se encontró que la acidez extracelular desencadena varios eventos celulares que incrementan el potencial metastásico de las células cancerosas; entre ellos, una mayor expresión y secreción de proteasas,⁵³ una mayor capacidad angiogénica, y un mayor potencial de generar tumores secundarios,⁵⁴ lo cual sugiere que la acidificación del pH tumoral es crucial para el desarrollo de metástasis. En un estudio realizado por Gillet, *et al.*,³⁵ se encontró que la actividad de los canales Na_v , específicamente $\text{Na}_v1.5$, promueve la acidificación perimembranal de células de cáncer de mama y la degradación de la matriz extracelular, a través de la potenciación de la actividad de catepsinas de cisteína. El mecanismo por el cual los canales Na_v ejercen este efecto se discute a continuación.

Invasividad

Estudios electrofisiológicos con la técnica de *patch clamp* han demostrado que el potencial de membrana de las células cancerosas generalmente se encuentra despolarizado en comparación con células de tejido sano. Debido a la expresión de canales Na_v , dicha condición de potencial permite la generación de una corriente de ventana debida a la actividad estocástica de una pequeña fracción de la población total de canales Na_v , lo que resulta en un flujo reducido, pero constante de sodio hacia el citoplasma.^{21,24,29,35,40}

Hasta el momento no se han caracterizado vías de señalización intracelular en las que el sodio desempeñe un papel como segundo mensajero; sin embargo, una alta concentración intracelular de sodio

puede invertir el sentido del funcionamiento de intercambiadores de sodio acoplados a calcio, bicarbonato o protones; repercutiendo en el aumento de la concentración citoplasmática de calcio, el cual sí puede activar distintas vías de señalización. Se ha mostrado que este efecto ocurre en condiciones patológicas como esclerosis múltiple, anoxia y angiogénesis.^{47,55} En un estudio reciente se mostró que en células de cáncer de mama el canal $\text{Na}_v1.5$ y el intercambiador Na^+/H^+ tipo 1 (NHE1) colocalizan en balsas lipídicas membranales y acoplan su actividad para llevar a cabo la extrusión de hidrogeniones del citosol; generando en consecuencia la acidificación de la periferia celular,⁵² lo que conlleva a la potenciación de la actividad de las catepsinas B y S, encargadas de la degradación de proteínas de matriz extracelular.³⁵ De esta manera los canales Na_v contribuyen en la remodelación del contexto extracelular, facilitando la movilidad y la invasividad de las células cancerosas.

PAPEL DE LAS SUBUNIDADES REGULADORAS β DE LOS CANALES Na_v EN LA CAPACIDAD INVASIVA DE LOS CARCINOMAS

Otros mecanismos que explican la relación de los canales Na_v con la movilidad celular se asientan en su íntima relación con las subunidades reguladoras β . Las subunidades β pueden interactuar con múltiples proteínas intra y extracelulares, desempeñándose como moléculas de adhesión y funcionando como intérpretes de moléculas de señalización.^{20,36,37} Por medio de ellas los canales Na_v pueden interactuar con proteínas del citoesqueleto como la ankirina y la espectrina, o con proteínas extracelulares como las tenasinas C y R, o la neurofascina,^{20,36} y de esta manera formar complejos proteicos que modulan la adhesión con células adyacentes y con la matriz extracelular.

En el cáncer de mama las células con una baja capacidad invasiva expresan mayores niveles de subunidades auxiliares β y presentan una mayor fuerza de adhesión que las células altamente invasivas. En un estudio realizado por Chioni, *et al.*,³³ se mostró que el bloqueo de la expresión de la subunidad $\text{Na}_v\beta1$ con RNAs de interferencia provoca la disminución de la fuerza de adhesión de células pobremente metastásicas y como consecuencia el incremento de la migración celular. Por su parte, la expresión transitoria de la subunidad $\text{Na}_v\beta1$ en células altamente metastásicas condujo a un aumento de la fuerza de adhesión y la disminución de la movilidad celular.

En el cáncer de próstata los niveles de expresión de subunidades β son mayores en líneas celulares altamente metastásicas en comparación con aquellas débilmente metastásicas, y al igual que en el cáncer de mama, la subunidad auxiliar $\text{Na}_V \beta 1$ es la más abundante. Sin embargo, en el cáncer de próstata la subunidad α mayormente expresada es $\text{Na}_V 1.7$, lo que sugiere que el efecto sobre la adhesión celular debido a la interacción entre subunidades α y β de los canales Na_V puede ser dependiente de la combinación de subunidades expresadas en cada tipo celular. Por otra parte, el posible papel de las subunidades β en la capacidad invasiva de distintos tipos de cáncer como el cervicouterino aún queda por investigarse.

CONCLUSIONES

Los estudios realizados hasta el momento indican que la expresión funcional de los canales Na_V en células cancerosas es fundamental para el desarrollo del fenotipo metastásico. Los mecanismos a través de los cuales ejercen este efecto comienzan a dilucidarse, y existen dos grandes líneas de investigación

que son complementarias y que buscan explicar la relación entre su expresión y el incremento de la invasividad celular. La primera, y más desarrollada, se centra en la actividad de la subunidad α como principal activador de vías celulares que de forma indirecta culminan en el incremento de la concentración de calcio citoplasmático y la remodelación del entorno extracelular. La segunda involucra la participación de las subunidades auxiliares β que, además de regular la cantidad y la actividad de canales Na_V en la membrana celular, desempeñan un papel de moléculas de adhesión y regulan la fuerza con la que las células cancerosas se adhieren a su sustrato. En la figura 2 se resume de manera esquemática las evidencias que soportan ambas teorías.

El potencial de los canales Na_V como marcadores moleculares y blancos terapéuticos del cáncer es muy prometedor; aun cuando se tienen evidencias sobre la importancia de su actividad en el desarrollo de metástasis, todavía se desconocen muchos detalles sobre su expresión, funcionamiento, regulación y papel en vías de señalización de las células tumorales, por lo que es necesaria una mayor cantidad de estu-

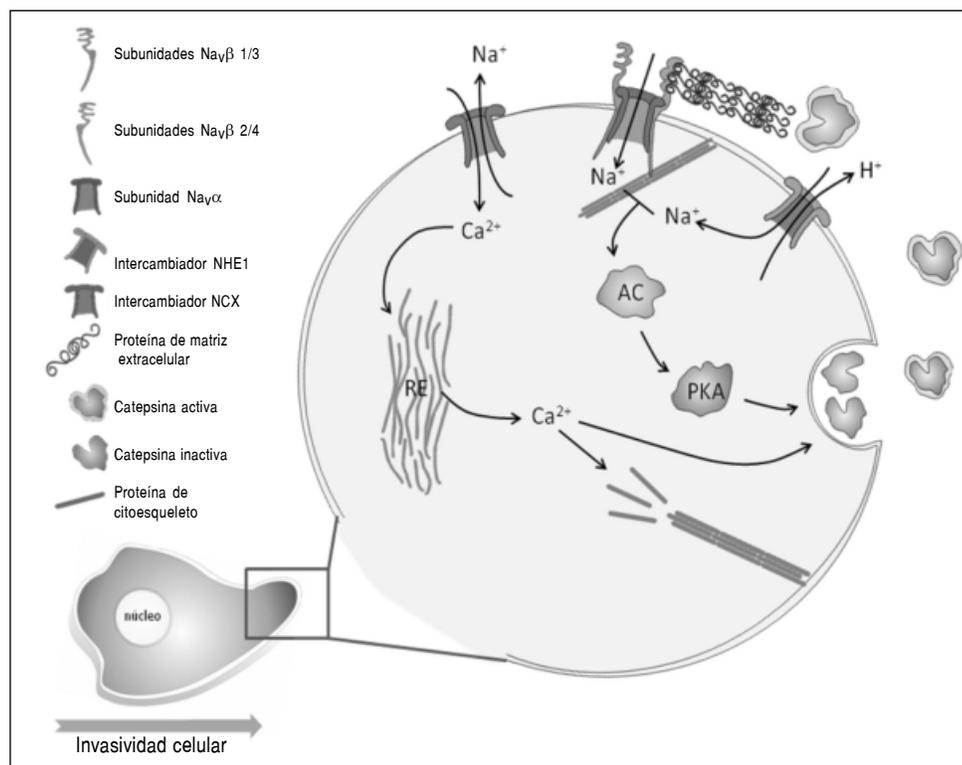


Figura 2. Mecanismos por los que los canales Na_V incrementan la invasividad de las células cancerosas. La célula genera invadopodios (regiones especializadas del citoesqueleto que modulan la adhesión celular; recuadro de figura, parte inferior izquierda) en el sentido en el que dirige su movimiento. En estas regiones membranales (amplificación) se ha reportado la coexpresión de canales Na_V y el intercambiador NHE1 ,⁵² cuya actividad acoplada promueve el incremento de la concentración intracelular de sodio $[\text{Na}]_i$ y la acidificación de la periferia extracelular. Una alta $[\text{Na}]_i$ estimula la actividad de la adenilato ciclasa,⁶⁰ y la cinasa de proteínas A (PKA), generando con ello una autorregulación positiva de su expresión y actividad.³⁷ El incremento en la concentración de H^+ en la región extracelular potencia la actividad de las cathepsinas encargadas de degradar la matriz extracelular.³⁵ Asimismo, una alta $[\text{Na}]_i$ puede invertir el sentido del

cotransportador NCX ,⁴⁸ lo que genera un aumento en la concentración de calcio, incrementando la exocitosis y la polimerización de proteínas del citoesqueleto en la dirección de movilidad celular. Las subunidades auxiliares β regulan la expresión membranar de las subunidad α e interactúan con proteínas de células adyacentes o de matriz extracelular para incrementar la fuerza de adhesión que la célula cancerosa establece con su entorno.

dios que permitan precisar su papel en la fisiología de la célula cancerosa y el desarrollo del fenotipo maligno.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece al Dr. Juan Carlos Gómora-Martínez, investigador titular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, por sus comentarios críticos a este artículo. A la M.C.B. Yendi Lestrade-Rodal por su apoyo en la generación de la figura 2; así como al personal de la biblioteca del mismo Instituto por su apoyo en la colecta de los artículos incluidos en esta revisión.

REFERENCIAS

1. Heron M. Deaths: leading causes for 2007. *Natl Vital Stat Rep* 2011; 59: 1-95.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-74.
3. Pardo LA, Contreras-Jurado C, Zientkowska M, Alves F, Stühmer W. Role of voltage-gated potassium channels in cancer. *J Membr Biol* 2005; 3: 115-24.
4. Panner A, Wurster RD. T-type calcium channels and tumor proliferation. *Cell Calcium* 2006; 40: 253-9.
5. Lui VC, Lung SS, Pu JK, Hung KN, Leung GK. Invasion of human glioma cells is regulated by multiple chloride channels including ClC-3. *Anticancer Res* 2010; 11: 4515-24.
6. Klein M, Seeger P, Schuricht B, Alper SL, Schwab A. Polarization of Na(+)/H(+) and Cl(-)/HCO₃(-) exchangers in migrating renal epithelial cells. *J Gen Physiol* 2000; 115: 599-608.
7. Cuddapah VA, Sontheimer H. Ion channels and transporters [corrected] in cancer. 2. Ion channels and the control of cancer cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011; 301: C541-C549.
8. Kunzelmann K. Ion channels and cancer. *J Membr Biol* 2005; 205:159-73.
9. Papadopoulos MC, Saadoun S, Verkman AS. Aquaporins and cell migration. *Pflugers Arch* 2008; 456: 693-700.
10. Blackiston DJ, McLaughlin KA, Levin M. Bioelectric controls of cell proliferation: ion channels, membrane voltage and the cell cycle. *Cell Cycle* 2009; 8: 3519-28.
11. Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends Mol Med* 2010; 16: 107-21.
12. Bennett ES, Smith BA, Harper JM. Voltage-gated Na⁺ channels confer invasive properties on human prostate cancer cells. *Pflugers Arch* 2004; 447: 908-14.
13. Fraser SP, Diss JK, Chioni AM, et al. Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5381-9.
14. Yildirim S, Altun S, Gumushan H, et al. Voltage-gated sodium channel activity promotes prostate cancer metastasis in vivo. *Cancer Lett* 2012.
15. Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 397-409.
16. Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000; 26: 13-25.
17. Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XXXIX. Compendium of voltage-gated ion channels: sodium channels. *Pharmacol Rev* 2003; 55: 575-8.
18. Goldin AL. Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol* 2001; 63: 871-94.
19. Yu FH, Catterall WA. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol* 2003; 4: 207.
20. Isom LL. The role of sodium channels in cell adhesion. *Front Biosci* 2002; 7: 12-23.
21. Roger S, Rollin J, Barascu A, et al. Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 774-86.
22. Cameron IL, Smith NK, Pool TB, Sparks RL. Intracellular concentration of sodium and other elements as related to mitogenesis and oncogenesis in vivo. *Cancer Res* 1980; 40: 1493-500.
23. Ouwerkerk R, Bleich KB, Gillen JS, Pomper MG, Bottomley PA. Tissue sodium concentration in human brain tumors as measured with ²³Na MR imaging. *Radiology* 2003; 227: 529-37.
24. Roger S, Besson P, Le Guennec JY. Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1616: 107-11.
25. Grimes JA, Fraser SP, Stephens GJ et al. Differential expression of voltage-activated Na⁺ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro. *FEBS Lett* 1995; 369: 290-4.
26. Smith P, Rhodes NP, Shortland AP, et al. Sodium channel protein expression enhances the invasiveness of rat and human prostate cancer cells. *FEBS Lett* 1998; 423: 19-24.
27. Diss JK, Archer SN, Hirano J, et al. Expression profiles of voltage-gated Na(+) channel alpha-subunit genes in rat and human prostate cancer cell lines. *Prostate* 2001; 48: 165-78.
28. Fraser SP, Diss JK, Lloyd LJ, et al. T-lymphocyte invasiveness: control by voltage-gated Na⁺ channel activity. *FEBS Lett* 2004; 569: 191-4.
29. House CD, Vaske CJ, Schwartz AM, et al. Voltage-gated Na⁺ channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion. *Cancer Res* 2010; 70: 6957-67.
30. Hernandez-Plata E, Ortiz CS, Marquina-Castillo B, et al. Overexpression of NaV 1.6 channels is associated with the invasion capacity of human cervical cancer. *Int J Cancer* 2012; 130: 2013-23.
31. Diaz D, Delgadillo DM, Hernandez-Gallegos E, et al. Functional expression of voltage-gated sodium channels in primary cultures of human cervical cancer. *J Cell Physiol* 2007; 210: 469-78.
32. Palmer CP, Mycielska ME, Burcu H, et al. Single cell adhesion measuring apparatus (SCAMA): application to cancer cell lines of different metastatic potential and voltage-gated Na⁺ channel expression. *Eur Biophys J* 2008; 37: 359-68.
33. Chioni AM, Brackenbury WJ, Calhoun JD, et al. A novel adhesion molecule in human breast cancer cells: voltage-gated Na⁺ channel beta1 subunit. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41: 1216-27.
34. Fraser SP, Ozerlat-Gunduz I, Onkal R, et al. Estrogen and non-genomic upregulation of voltage-gated Na(+) channel activity in MDA-MB-231 human breast cancer cells: role in adhesion. *J Cell Physiol* 2010; 224: 527-39.
35. Gillet L, Roger S, Besson P, et al. Voltage-gated Sodium Channel Activity Promotes Cysteine Cathepsin-dependent Invasiveness and Colony Growth of Human Cancer Cells. *J Biol Chem* 2009; 284: 8680-91.
36. Malhotra JD, Kazen-Gillespie K, Hortsch M, Isom LL. Sodium channel beta subunits mediate homophilic cell adhesion and re-

- cruit ankyrin to points of cell-cell contact. *J Biol Chem* 2000; 275: 11383-8.
37. Brackenbury WJ, Davis TH, Chen C, et al. Voltage-gated Na⁺ channel beta1 subunit-mediated neurite outgrowth requires Fyn kinase and contributes to postnatal CNS development in vivo. *J Neurosci* 2008; 28: 3246-56.
 38. Fraser SP, Salvador V, Manning EA, et al. Contribution of functional voltage-gated Na⁺ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: I. Lateral motility. *J Cell Physiol* 2003; 195: 479-87.
 39. Pan H, Djamgoz MB. Biochemical constitution of extracellular medium is critical for control of human breast cancer MDA-MB-231 cell motility. *J Membr Biol* 2008; 223: 27-36.
 40. Fulgenzi G, Graciotti L, Faronato M, et al. Human neoplastic mesothelial cells express voltage-gated sodium channels involved in cell motility. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 1146-59.
 41. Schwab A. Function and spatial distribution of ion channels and transporters in cell migration. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280: F739-F747.
 42. Djamgoz MBA, Mycielska M, Madeja Z, et al. Directional movement of rat prostate cancer cells in direct-current electric field: involvement of voltage-gated Na⁺ channel activity. *J Cell Sci* 2001; 114: 2697-705.
 43. Nuccitelli R. A role for endogenous electric fields in wound healing. *Curr Top Dev Biol* 2003; 58: 1-26.
 44. Mycielska ME, Djamgoz MB. Cellular mechanisms of direct-current electric field effects: galvanotaxis and metastatic disease. *J Cell Sci* 2004; 117: 1631-9.
 45. Yan X, Han J, Zhang Z, et al. Lung cancer A549 cells migrate directionally in DC electric fields with polarized and activated EGFRs. *Bioelectromagnetics* 2009; 30: 29-35.
 46. Pu J, McCaig CD, Cao L, et al. EGF receptor signalling is essential for electric-field-directed migration of breast cancer cells. *J Cell Sci* 2007; 120: 3395-403.
 47. Craner MJ, Newcombe J, Black JA, et al. Molecular changes in neurons in multiple sclerosis: altered axonal expression of Nav1.2 and Nav1.6 sodium channels and Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 8168-73.
 48. Andrikopoulos P, Baba A, Matsuda T, et al. Ca²⁺ influx through reverse mode Na⁺/Ca²⁺ exchange is critical for vascular endothelial growth factor-mediated extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 activation and angiogenic functions of human endothelial cells. *J Biol Chem* 2011; 286: 37919-31.
 49. Ishibashi H, Dinudom A, Harvey KF, Kumar S, Young JA, Cook DI. Na⁺-H⁺ exchange in salivary secretory cells is controlled by an intracellular Na⁺ receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9949-53.
 50. Mycielska ME, Fraser SP, Szatkowski M, Djamgoz MB. Contribution of functional voltage-gated Na⁺ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: II. Secretory membrane activity. *J Cell Physiol* 2003; 195: 461-9.
 51. Stys PK. White matter injury mechanisms. *Curr Mol Med* 2004; 4: 113-30.
 52. Brisson L, Gillet L, Calaghan S, et al. Na(V)1.5 enhances breast cancer cell invasiveness by increasing NHE1-dependent H(+) efflux in caveolae. *Oncogene* 2011; 30: 2070-6.
 53. Bourguignon LY, Singleton PA, Diedrich F, et al. CD44 interaction with Na⁺-H⁺ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *J Biol Chem* 2004; 279: 26991-7007.
 54. Rofstad EK, Mathiesen B, Kindem K, Galappathi K. Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer Res* 2006; 66: 6699-707.
 55. Andrikopoulos P, Fraser SP, Patterson L, et al. Angiogenic functions of voltage-gated Na⁺ Channels in human endothelial cells: modulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling. *J Biol Chem* 2011; 286: 16846-60.
 56. Ou SW, Kameyama A, Hao LY, et al. Tetrodotoxin-resistant Na⁺ channels in human neuroblastoma cells are encoded by new variants of Nav1.5/SCN5A. *Eur J Neurosci* 2005; 22: 793-801.
 57. Gao R, Shen Y, Cai J, et al. Expression of voltage-gated sodium channel alpha subunit in human ovarian cancer. *Oncol Rep* 2010; 23: 1293-9.
 58. Diss JK, Stewart D, Pani F, Foster CS, Walker MM, Patel A, Djamgoz MB. A potential novel marker for human prostate cancer: voltage-gated sodium channel expression in vivo. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2005; 8: 266-73.
 59. Diss JK, Fraser SP, Walker MM, et al. Beta-subunits of voltage-gated sodium channels in human prostate cancer: quantitative in vitro and in vivo analyses of mRNA expression. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2008; 11: 325-33.
 60. Cooper DM, Schell MJ, Thorn P, Irvine RF. Regulation of adenylyl cyclase by membrane potential. *J Biol Chem* 1998; 273: 27703-7.

Reimpresos:

M. en C. Everardo Hernández-Plata
 Departamento de Neuropatología Molecular
 División de Neurociencias
 Instituto de Fisiología Celular,
 Universidad Nacional Autónoma de México.
 04510, México, D.F.
 Tel.: (5255) 5622-5752
 Fax: (5255) 5622-5607
 Correo electrónico: ehplata@email.ifc.unam.mx

*Recibido el 4 de junio 2012.
 Aceptado el 9 de octubre de 2012.*