



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE mRNAs DE CÉLULAS DE  
NEUROBLASTOMA N1E-115 EN RESPUESTA A LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA DEL  
EXTREMO CARBOXILO TERMINAL DEL CANAL DE SODIO DEPENDIENTE DE  
VOLTAJE  $Na_v1.2$**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

**PRESENTA:**

**BIOL. JULIO CÉSAR LUNA ROJAS**

**TUTORA PRINCIPAL:**

**DRA. ANA VICTORIA VEGA SALCEDO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**COMITÉ TUTOR:**

**DR. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES**

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**DRA. EDITH GARAY ROJAS**

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**DRA. MYRIAM CAMPOS AGUILAR**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**DR. JUAN MANUEL ARIAS MONTAÑO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO. NOVIEMBRE DEL 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCYT), proyecto A1-S-36984 y el PAPIIT-UNAM (IN220223), otorgados a la Dra. Ana Victoria Vega Salcedo.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por brindarme la oportunidad de continuar mi formación profesional a través de la Maestría en Ciencias (Neurobiología)

Al CONAHCYT, por otorgar una beca nacional que ha sido de gran apoyo para lograr la culminación de este proyecto (CVU: 1085485).

A los miembros de mi comité tutor, Dr. Juan Manuel Arias Montaña y al Dr. Vijaykumar Yoguesh Muley, por el tiempo, asesorías y comentarios que permitieron llevar a buen término este trabajo y me dejaron enseñanzas para mi vida profesional.

A los miembros de mi jurado de tesis, Dra. Edith Garay Rojas, Dra. Myriam Campos Aguilar, Dr. Ataúlfo Martínez Torres, Dr. Juan Manuel Arias Montaña, por su tiempo, observaciones y correcciones, hechas siempre con el fin de mejorar, pulir este trabajo y hacerme ver mis áreas de oportunidad para mejorar mis habilidades como científico.

A mi tutora, la Dra. Ana Victoria Vega Salcedo, por confiar en mí, por retarme, apoyarme de mil y un maneras, por contagiarme siempre la pasión por hacer ciencia y por las incontables horas analizando los datos.

A mis compañeros de laboratorio y colegas que se desempeñan en el ejercicio profesional, Erik, Luis, Andrés, Axel, por el apoyo, las críticas, y por supuesto, los festejos.

Con mucho cariño a la maestra Alexa y a la maestra Lore, lo que hicieron por mí no se puede pagar con dinero, siempre estaré agradecido de encontrarme con personas como ustedes, que me abrieron las puertas de su casa.

A los compañeros que se volvieron amigos, Juan Carlos, Jocelyn, sin su apoyo no hubiese logrado mantener la beca, gracias por despertarme y motivarme cuando me quedaba dormido estudiando.

A María Elena, Fernando y Paola, mi familia, por y para ustedes, los amo.

## ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>Canales de sodio estructura y función</b>	<b>7</b>
<b>Funciones no canónicas de los canales iónicos</b>	<b>9</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>11</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
<b>General:</b>	
<b>Específicos:</b>	
<b>MÉTODO</b>	<b>17</b>
<b>Cultivo de células N1E-115</b>	<b>17</b>
<b>Transfección</b>	<b>18</b>
<b>Extracción de ARN</b>	<b>20</b>
<b>Integridad y Concentración</b>	<b>20</b>
<b>Microarreglos</b>	<b>21</b>
Corrección de fondo	
Valor de R	
Filtrado por intensidad	
Selección de expresión diferencial de genes	
<b>Análisis comparativo en bases de datos</b>	<b>23</b>
<b>Diseño de cebadores</b>	<b>24</b>
<b>RT</b>	<b>26</b>
<b>PCR punto final</b>	<b>26</b>
<b>qRT-PCR</b>	<b>27</b>
<b>Análisis Estadístico</b>	<b>27</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>28</b>
<b>Calibración de la transfección (ADN: PEI)</b>	<b>28</b>
<b>Extracción, Integridad y Concentración del ARN</b>	<b>28</b>
<b>Análisis bioinformático del microarreglo, <i>KEGG</i> y <i>Harmonizome</i>.</b>	<b>30</b>
<b>PCR (calibración de condiciones de amplificación)</b>	<b>34</b>
<b>sqRT-PCR</b>	<b>37</b>

<b>DISCUSIÓN</b>	<b>42</b>
<b>Generalidades de la vía JAK-STAT</b>	<b>44</b>
<b>Tyk2</b>	<b>46</b>
Papel de TYK2 en sistema nervioso	
Papel de TYK2 en el cáncer	
<b>Socs2</b>	<b>50</b>
Retroalimentación negativa de la vía de señalización de GH	
Papel en la enfermedad de Huntington	
Papel en la neurogénesis hipocampal adulta	
Papel en el cáncer	
<b>Stam 1</b>	<b>54</b>
Evidencias de Stam1 en sistema nervioso	
Evidencias de expresión de Stam1 en estudios en cáncer	
<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>57</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>58</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>61</b>

## RESUMEN

Los canales de sodio activados por voltaje ( $\text{Na}_v$ ) mantienen el balance de iones dentro de células excitables y su función más conocida es llevar a cabo el inicio y propagación del potencial de acción. La expresión de las isoformas  $\text{Na}_v1.1$ ,  $1.2$ ,  $1.3$  y  $1.6$  es predominante en el sistema nervioso central de mamíferos, sin embargo, se ha documentado la expresión de distintos miembros de esta familia de proteínas en células no excitables, e incluso células cancerosas. Nuestro grupo de investigación ha reportado anteriormente que la proteína involucrada en la transcripción conocida como mSin3B puede interactuar con  $\text{Na}_v1.2$  en la membrana plasmática, a través de su extremo C-terminal (Vega *et al.*, 2013). Interesantemente, también hemos observado que el extremo C-terminal de la isoforma  $\text{Na}_v1.2$  tiene una señal de localización nuclear (NLS). Esto nos llevó a preguntarnos si este fragmento está implicado en la regulación de la transcripción. Evaluamos dicho cambio en la expresión de mRNAs empleando la tecnología de microarreglos con muestras de ARN total de células transfectadas con un plásmido control (pEGFP-C1) que codifica la proteína verde fluorescente (GFP), o con un plásmido que codifica el C-terminal de  $\text{Na}_v1.2$  en fusión con GFP (pEGFP- $\text{Na}_v1.2\text{CT}$ ), en la línea celular de neuroblastoma N1E-115. De esta forma, encontramos cambios en la expresión de un grupo de 10 genes involucrados en la vía de señalización intracelular JAK-STAT, 4 de los cuales son blanco de mSin3B (Il11, Stam1, Tyk2 y Socs2). Para verificar los cambios reportados en el microarreglo, se realizaron mediciones por sqRT-PCR en un total de 5 mensajeros, incluyendo al receptor de Il6, cuyo gen no es blanco de mSin3B. De esta forma encontramos que Stam1, Tyk2 y Socs2 tuvieron un aumento en las células transfectadas con el  $\text{Na}_v1.2\text{CT}$  con respecto al control. Por otro lado, Il6ra e Il11 mostraron una tendencia al aumento de expresión, sin embargo, esta no tuvo significancia estadística. En conclusión, la expresión heteróloga del extremo carboxilo terminal del  $\text{Na}_v1.2$  en la línea celular de neuroblastoma N1E-115, produjo cambios a nivel transcripcional en tres genes blancos de Sin3B, Stam1, Socs2 y Tyk2. Dado que el carboxilo terminal de  $\text{Na}_v1.2$  interactúa físicamente con mSin3B, nuestros resultados sugieren que dicha interacción puede estar afectando la actividad transcripcional de mSin3B en esta línea celular.

## SUMMARY

Voltage-activated sodium channels ( $\text{Na}_v$ ) maintain the ion balance within excitable cells and their best known function is the initiation and propagation of action potential. The expression of  $\text{Na}_v$ 1.1 isoforms, 1.2, 1.3 and 1.6 is predominant in the mammalian central nervous system, however, the expression of different members of this family of proteins in non-excitabile cells has been documented, and even in cancer cells. Our research group has found that the protein involved in the transcription known as mSin3B can interact with  $\text{Na}_v$ 1.2 in the plasma membrane, through its C-terminal end (Vega et al., 2013). Interestingly, we have also observed that the C-terminal end of the  $\text{Na}_v$ 1.2 isoform has a nuclear location signal (NLS). This led us to question whether this fragment is involved in the regulation of transcription. We evaluated this change in mRNA expression using microarray technology with total RNA samples of cells transfected with a control plasmid (pEGFP-C1) encoding the fluorescent green protein (GFP), or with a plasmid encoding the C-terminal of  $\text{Na}_v$ 1.2 in fusion with GFP (pEGFP- $\text{Na}_v$ 1.2CT), in the neuroblastoma N1E-115 cell line.

As result, we found changes in the expression of a group of 10 genes involved in the intracellular signaling pathway JAK-STAT. Four out of ten are Sin3B targets (Il11, Stam1, Tyk2 and Socs2). To verify the changes reported in the microarray assay, measurements by sqRT-PCR were performed on a total of 5 messengers, including the Il6 receptor, a non-target for mSin3B. Thus, we found that Stam1, Tyk2 and Socs2 had an increase in cells transfected with  $\text{Na}_v$ 1.2CT versus the control. On the other hand, Il6ra and Il11 showed a tendency to decrease its expression, however, it was not statistically significant. In conclusion, the heterologous expression of the terminal carboxyl end of  $\text{Na}_v$ 1.2 in the neuroblastoma N1E-115 cell line produced transcriptional changes in three Sin3B-target genes, Stam1, Socs2 and Tyk2. Since the terminal carboxyl of  $\text{Na}_v$ 1.2 physically interacts with mSin3B, our results suggest that such interaction may be affecting the transcriptional activity of mSin3B in this cell line.

## INTRODUCCIÓN

Los primeros trabajos realizados acerca de los canales de sodio activados por voltaje se centraron en entender sus propiedades eléctricas y cómo es que mantienen el balance de iones dentro de la célula neuronal (Revisado por Catterall, 2013), sin embargo se ha encontrado que la expresión de distintas isoformas y funciones adicionales de esta familia de proteínas en células no excitables, entre ellas, astrocitos (Reese y Caldwell, 1999), células endoteliales (Traub *et al.*, 1999), fibroblastos (Chatelier *et al.*, 2012), macrófagos (Black *et al.*, 2013), microglía (Nicholson y Randal, 2009), células  $\beta$ -pancreáticas (Eberhardson y Grapengiesser, 1999) e incluso células cancerosas (Brackenbury *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2012). En este trabajo presentaremos evidencias que nos han llevado a proponer una nueva función de los canales de sodio, o más precisamente, del extremo carboxilo terminal de las isoformas  $\text{Na}_v1.2$

### **Canales de sodio estructura y función**

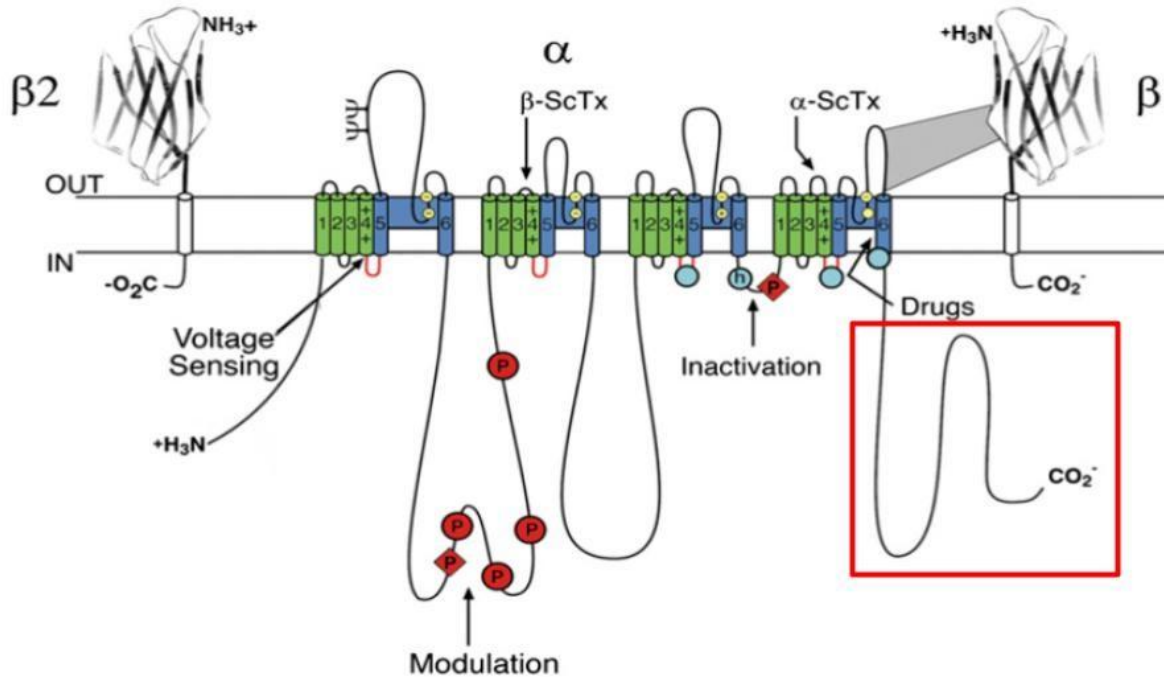
Se sabe que los canales de sodio están compuestos por una subunidad alfa ( $\alpha$ ) de 260 kDa y que puede formar complejos con una o dos subunidades beta ( $\beta$ ) más pequeñas, de 30 kDa (Beneski y Catterall, 1980). Luego de solubilizar y purificar canales de sodio a partir de tejido nervioso, se encontró que la subunidad  $\alpha$  interactúa mediante enlaces no covalentes con la subunidad  $\beta_1$  y por enlaces disulfuro con la  $\beta_2$ , las cuales se sabe modulan la cinética y dependencia del voltaje de estos canales (Hartshorne *et al.*, 1982; Hartshorne y Catterall, 1984). Actualmente sabemos que el ARNm que codifica para la subunidad  $\alpha$  en cerebro de rata es suficiente para constituir un canal funcional (Goldin *et al.*, 1986).

La subunidad  $\alpha$  está constituida por 2000 residuos de aminoácidos organizados en 4 dominios homólogos (DI-DIV) y estos a su vez compuestos de 6 segmentos transmembranales (SI-S6), de los cuales, el segmento S4 de cada dominio funciona como sensor de voltaje, mientras que los segmentos S5-S6 de cada dominio recubren el poro del canal (Noda *et al.*, 1989). Otra propiedad de los canales es la inactivación dependiente de voltaje, la cual ocurre a pesar de la entrada de un pulso despolarizante, y se ha identificado un asa intracelular entre los dominios 3 y 4 como la puerta de inactivación, en esta se encontró una secuencia de aminoácidos comprendidos por Isoleucina, Fenilalanina y Metionina los cuales son críticos en este proceso (Revisado por Kruger e Isom, 2016).

Una de las primeras toxinas que sirvieron para el estudio de estos canales fue la tetrodotoxina, una toxina que bloquea el poro mediante su unión a aminoácidos



de los segmentos S5 y S6, lo cual ayudó a determinar el papel de dichos segmentos en la formación del poro. Estos canales también son blanco de distintos fármacos utilizados como anestésicos locales, antiarrítmicos y antiepilépticos, con su sitio de unión formado por los residuos de aminoácidos en el segmento S6 en los dominios I y III, impidiendo el paso de iones (Figura 1) (Vassilev, 1988).



**Figura 1.** Estructura general de los canales de sodio activados por voltaje, resaltado en recuadro rojo el fragmento carboxilo terminal.

Los canales de sodio son codificados por 10 genes, agrupados en una sola familia. Su expresión en distintos tejidos excitables es diferencial, por ejemplo, las isoformas  $Na_v1.1$ ,  $1.2$ ,  $1.3$  y  $1.6$  son los principales miembros en el sistema nervioso central de mamíferos (Revisado por Catterall, 2013). Mientras que las isoformas  $Na_v1.4$  y  $1.5$  se expresan principalmente en tejido muscular.

A partir del trabajo hecho acerca de las corrientes de sodio y otros iones en el axón gigante de calamar a principios de la década de los 50 (Hodgkin y Huxley, 1952), y de los estudios sobre la estructura del canal en las décadas de los 80 y 90's, el papel de los canales de sodio en las células eléctricamente excitables quedó firmemente establecido como parte esencial del mecanismo de disparo de potenciales de acción. Sin embargo, en años más recientes, algunos hallazgos en el campo de los canales apuntan a que algunos canales iónicos podrían participar en otros procesos celulares igualmente importantes.

## Funciones no canónicas de los canales iónicos

La idea de que los canales iónicos pueden tener funciones adicionales a su papel como conductores, inicia con las observaciones de Isom y colaboradores quienes determinaron que la subunidad  $\beta$  de los canales de sodio se encuentra compuesta de un dominio N-terminal (NH<sub>2</sub>) extracelular, plegado similar a la inmunoglobulina, un segmento transmembrana y un segmento corto intracelular, los cuales se piensa, forman complejos heterodímeros e incluso heterotriméricos, desempeñando un papel importante en la modulación de la cinética y dependencia de voltaje para la activación e inactivación, también se sabe que el dominio extracelular funciona como molécula de adhesión celular ya que interactúa con proteínas de matriz extracelular y otras moléculas de adhesión (Isom *et al.*, 1995).

Más aún, Gómez-Ospina *et al.*, (2006), hallaron evidencias acerca de que un fragmento del extremo C-terminal (CT) de un canal de calcio dependiente de voltaje tipo L (Ca<sub>v</sub>1.2), se transloca al núcleo y puede regular la transcripción. Esto se demostró mediante la expresión heteróloga, en células Neuro2A, de una proteína de fusión entre el CCAT y el dominio de unión a ADN presente en levadura, llamado Gal4 (Cav1.2CT-Gal4). Este dominio de unión reconoce la secuencia UAS-ADN, sin embargo, para activar la transcripción se requiere de un dominio de activación. En este caso se empleó un gen reportero (UAS- luciferasa), la cual permitió medir la expresión por medio de su intensidad lumínica, esta intensidad aumentó cerca de 80 veces con respecto al control sin CCAT, por lo que concluyeron que CCAT puede funcionar como factor de transcripción.

Además, emplearon ARN de células HEK293 transfectadas con el fragmento CCAT, y, con tecnología de microarreglos reconocieron 66 genes importantes para la señalización neuronal y la excitabilidad. Estos hallazgos proporcionan evidencia de que los canales de calcio dependientes de voltaje pueden verse involucrados directamente en la activación de la transcripción y sugiere un mecanismo que vincula los canales activados por voltaje con la función y diferenciación de células excitables.

Por otro lado, Mironova y cols., (2010), reportaron que la secuencia primaria de  $\gamma$ -ENaC (canal de sodio epitelial), revela posibles señales de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés) conservadas en el extremo NH<sub>2</sub>, muy próximas al primer dominio transmembrana. Se ha sugerido que, en proteínas dirigidas al núcleo, grupos de aminoácidos, en particular arginina y lisina, señalizan el anclaje a moléculas transportadoras encontradas en el poro nuclear y, se ha propuesto que hexapéptidos con cuatro argininas y dos lisinas son candidatos para

considerarse NLS, también que los dominios ácidos de proteínas pueden participar en el anclaje y la NLS puede tener funciones tanto citoplásmicas como nucleares (Boulikas, 1993).

Con respecto a los canales de sodio activados por voltaje, recientemente Onwuli *et al.*, (2017), encontraron que en la secuencia del asa intracelular que une los dominios I-II se encuentra una NLS funcional. La expresión heteróloga de dicho fragmento se dirige al núcleo, y regula de manera positiva la transcripción del gen SCN5A por incremento en la actividad del promotor. La liberación de dicha cadena intracelular, como sugieren Onwuli y colaboradores podría ser mediada por proteasas, como por ejemplo las calpaínas, ya que se ha documentado que tienen un sitio de corte en el asa intracelular I-II de la isoforma Na<sub>v</sub>1.2, aunque no liberan el fragmento como tal (von Reyn *et al.*, 2012), tampoco está claro si puede hacer lo mismo con la isoforma Na<sub>v</sub>1.5.

Adicionalmente, se ha documentado que la expresión del Na<sub>v</sub>1.5 (isoforma predominantemente cardíaca) en cáncer de colon se correlaciona con mayor potencial invasivo ya que el bloqueo con TTX o con ARN de interferencia (ARNi) reduce dicho potencial y resulta en la regulación negativa de genes involucrados en migración celular (House, 2010), también Na<sub>v</sub>1.5 aumenta la migración y el potencial invasor de células metastásicas de cáncer de mama (Brackenbury *et al.* 2007), aunque se desconoce el mecanismo exacto.

Por otro lado, es extensa la evidencia de la expresión de subunidades  $\alpha$  de los canales de sodio en distintos tipos de cáncer por ejemplo de mama, linfoma y neuroblastoma, en estos tipos el gen que más se expresa es SCN5A que codifica para Na<sub>v</sub>1.5. La isoforma Na<sub>v</sub>1.2 es reportada en cáncer de ovario y próstata, mientras la isoforma Na<sub>v</sub>1.6 se ha reportado en cáncer de mama, cervical y linfoma, la mayoría de estos hallazgos se han realizado en líneas celulares de estos tipos de cáncer, también la expresión de algunas subunidades a nivel de ARNm y proteína se ha asociado con una mayor capacidad metastásica en especial las codificadas por los genes SCN5A y SCN9A (Na<sub>v</sub>1.7) (Revisado por Brackenbury, 2012).

## ANTECEDENTES

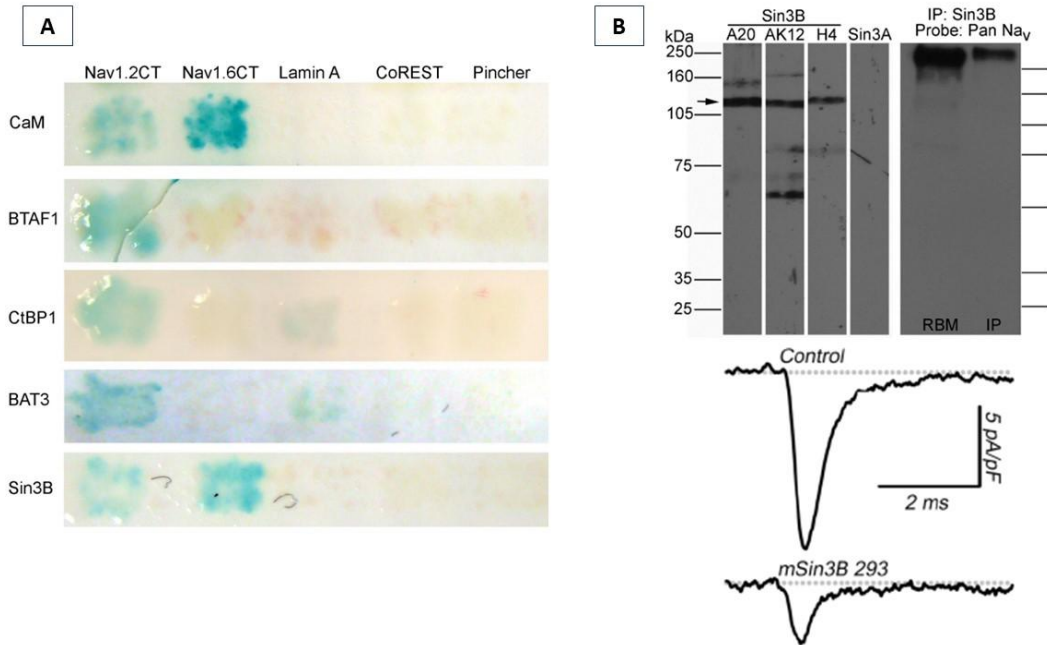
Datos originales de nuestro laboratorio demostraron la interacción del extremo CT de las isoformas Na<sub>v</sub>1.2 y Na<sub>v</sub>1.6 con mSin3B, aunque solamente se ha explorado a nivel de la membrana plasmática. Las evidencias iniciales surgen de ensayos de doble híbrido, en el cual se exploró la interacción del carboxilo terminal de Na<sub>v</sub>1.2 y Na<sub>v</sub>1.6 contra una genoteca de cerebro de ratón, para identificar proteínas que pudieran unirse a dicha región del canal. El ensayo de doble híbrido se basa en la construcción de un plásmido que contiene la secuencia de la proteína a estudiar (cebo) unido a un dominio de unión a ADN (BD) y una segunda construcción compuesta por la librería de expresión de todas las proteínas del genoma de ratón unida a un dominio de activación (AD).

La interacción entre estas dos proteínas reconstruye un factor de transcripción que regula la expresión de un gen reportero (la β-galactosidasa), la interacción de los híbridos acercará el dominio de unión a ADN al dominio de activación promoviendo la expresión del gen reportero. La expresión de β-galactosidasa promueve la degradación de un agente sintético, el X-gal, lo que genera un color azul, evidenciando así la interacción entre dos proteínas. Como se puede ver en la Figura 2A, este ensayo mostró que el CT de Na<sub>v</sub>1.2 interactúa con mSin3B (Vega *et al.*, 2013), CtBP1 (Romero-Macías, 2021) y con al menos otros 2 factores de transcripción BTAF1 y BAT3 (Figura 2).

Adicionalmente, Vega y cols. (2013), también reportaron que mSin3B no sólo se encuentra en un contexto nuclear, sino que también puede encontrarse en la membrana plasmática donde puede interactuar con canales de sodio. Más aún, inmunoprecipitaron a mSin3B de fracciones membranales de cerebro de rata mostraron la presencia de canales de sodio (Figura 2B). Esta interacción puede modificar las corrientes a través de estos canales sin afectar su expresión a nivel de proteína, lo cual sugiere que esta interacción modifica la translocación del canal en la membrana produciendo una menor densidad de canales a lo largo de la célula y reduce de esa forma la corriente entrante a la misma (Vega *et al.*, 2013). Por otro lado cabe preguntarse si la expresión anómala de canales de sodio, como sucede en el caso de células cancerosas, puede estar alterando la distribución y concentración en compartimentos subcelulares de mSin3B y de esta forma altera la función de mSin3B en el núcleo.

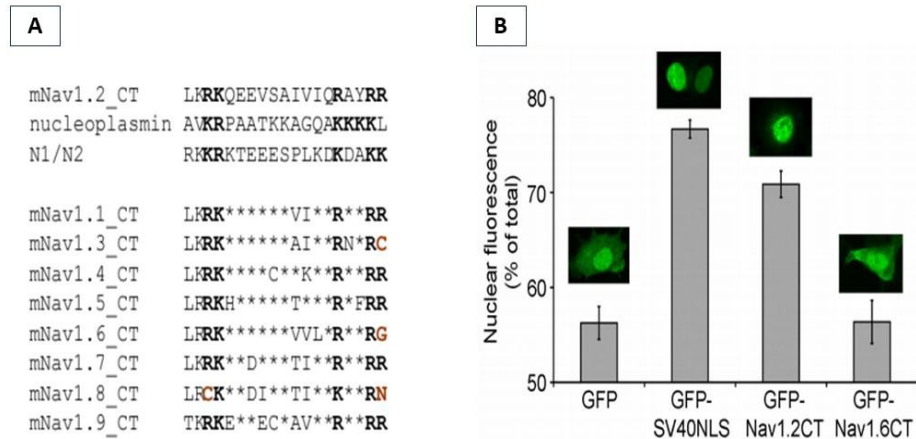
Cabe resaltar que el Sin3B no tiene dominio de unión al ADN reconocido, su función es como proteína adaptadora para múltiples factores de transcripción con actividad represiva, este complejo reúne proteínas como las HDAC1/2, histona lisina metilasas (por ejemplo, ESET) y desmetilasas (por ejemplo, RBP2/JARID1A), las cuales están implicadas en el silenciamiento de genes, así como SAP30, SAP18, la proteína de unión metilada CpG (MeCP2) y varios

reguladores de la transcripción (p53, Rb, E2F, SMAR1 y REST/NRSF) (Revisado por Kadamb *et al.*, 2013).



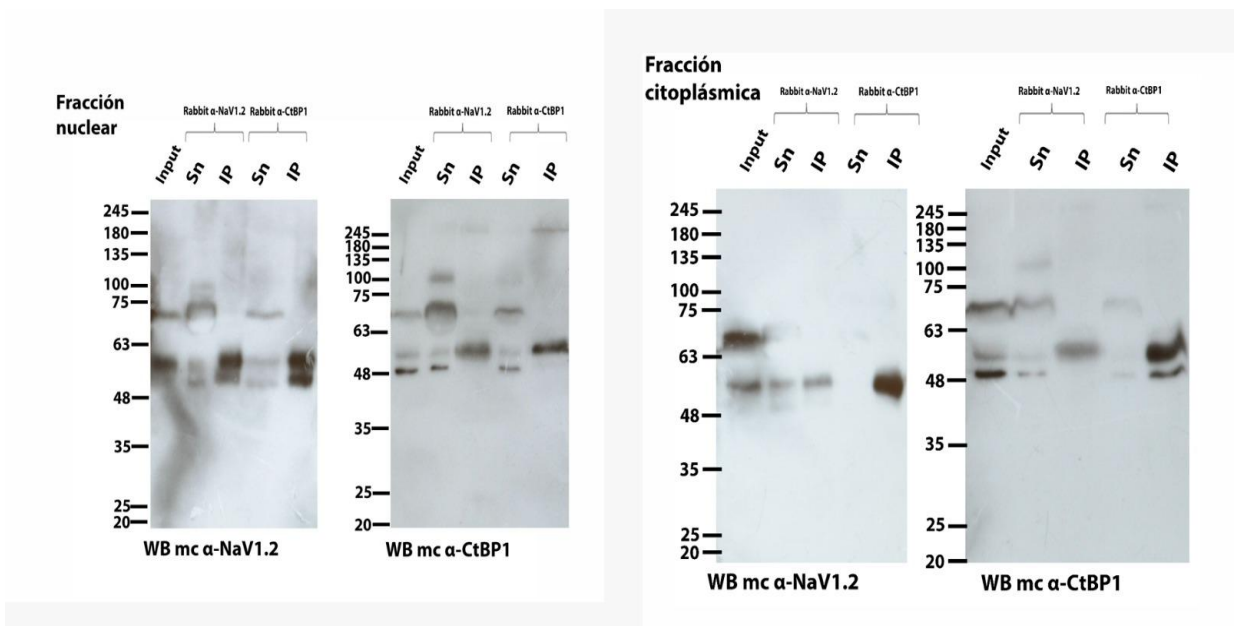
**Figura 2.** A la izquierda un ensayo de doble híbrido de levadura, demostrando la interacción entre el CT de las isoformas 1.2 y 1.6 de los  $Na_v$  y proteínas como la calmodulina (control positivo), así como 3 proteínas no relacionadas con la membrana plasmática (Lamin A, CoREST, Pincher). A la derecha, western blot de las fracciones de membrana de cerebro de rata probadas con anticuerpos anti-Sin3B (A20, AK12 o H4), o con el anticuerpo anti-Sin3A K20, correspondiente a la figura A. Los tres anticuerpos anti-Sin3B detectaron bandas con la masa molecular adecuada para las isoformas largas de Sin3B. Figura 1B carril izquierdo: preparación de membrana de cerebro de rata (RBM). Carril derecho: material inmunoprecipitado (IP) con anti-Sin3B.

Por otro lado, aunque la distribución habitual de los canales iónicos es predominantemente membranar, un análisis *in silico* de la secuencia del CT de los canales de sodio nos permitió observar que 6 de las 9 isoformas de los canales de sodio presentan una NLS que consiste en agrupamientos de argininas y lisina (Figura 3A). Adicionalmente en un experimento no publicado del laboratorio se estudió la distribución del fragmento CT de las isoformas que contienen dicha secuencia, empleando una proteína de fusión entre  $Na_v1.2CT$  y la proteína verde fluorescente (GFP), encontramos que la proteína quimérica tiene una distribución predominantemente nuclear (Figura 3B), lo que contribuye a reforzar la idea de que la NLS en el CT de algunas isoformas de canales de sodio es funcional y que puede trasladarse al núcleo, lo que puede facilitar la unión con sin3B en su ambiente nativo.



**Figura 3.** (A), análisis *in silico*, donde se observa la comparación de secuencias de aminoácidos de la región del CT de las 9 isoformas de los canales de sodio, 6 de las 9 isoformas presentan una NLS. (B) distribución del fragmento CT, proteína de fusión entre Nav1.2CT y la proteína verde fluorescente (GFP), la proteína quimérica tiene una distribución predominantemente nuclear, mientras que Nav1.6CT no presenta la misma distribución, esto debido a la ausencia de la NLS en su secuencia del CT

Más recientemente, y reforzando la idea de que el extremo carboxilo terminal puede trasladarse al núcleo e interactuar con factores de transcripción, Romero-Macías, (2021), detectó la presencia de un fragmento de ~53 kDa en fracciones nucleares y citoplasmáticas de extractos de cerebro de ratón, usando dos anticuerpos contra el CT de Nav1.2. Resulta interesante que, la misma banda fue identificada en inmunoprecipitaciones con anticuerpos dirigidos contra el factor de transcripción CtBP1 (Figura 4). Por lo que pensamos que al menos un fragmento del canal podría tener una función no canónica en distintos contextos subcelulares a través de la interacción con otras proteínas, como el Sin3B o el CtBP1, que cuentan con la capacidad de constituir complejos que modifican la transcripción.



**Figura 4.** inmunoprecipitación con anticuerpos dirigidos contra el factor de transcripción CtBP1 y anticuerpos contra el CT de Nav1.2, donde se encontró un fragmento de ~53 kDa en fracciones nucleares y citoplásmicas de extractos de cerebro de ratón.

En resumen, estos antecedentes nos llevaron a plantear la siguiente hipótesis.

## **HIPÓTESIS**

- 1) Dada la presencia de la NLS funcional en el CT del Na<sub>v</sub>1.2 y su capacidad de interactuar con mSin3B, CtBP1 y al menos 2 factores de transcripción más, la expresión heteróloga del Na<sub>v</sub>1.2CT altera la expresión de ARNm en la línea celular N1E-115.
- 2) Más específicamente, alguno o algunos de estos mensajeros pueden ser blancos de regulación de mSin3B.



## **OBJETIVOS**

### **General:**

- Determinar si el extremo carboxilo de la isoforma Na<sub>v</sub>1.2 modula la actividad transcripcional en células de neuroblastoma (N1E-115).

### **Específicos:**

- Estandarizar las condiciones de densidad de siembra de la línea celular y de la transfección con plásmidos pEGFP y pEGFP-Na<sub>v</sub>1.2CT y obtener ARN total.
- Analizar por microarreglos la expresión de los ARN mensajeros, después de la transfección de pEGFP y pEGFP-Na<sub>v</sub>1.2CT
- Identificar ARN mensajeros regulados de manera significativa en los experimentos de microarreglos
- Investigar a través de herramientas bioinformáticas la o las vías de señalización enriquecidas con los mensajeros regulados en los experimentos de microarreglos.
- Identificar los mensajeros dentro la vía de señalización previamente seleccionada, que estén relacionados a mSin3B en bases de datos que contengan resultados de experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChiP).
- Medir la expresión de los mensajeros identificados empleando qRT-PCR.

## MÉTODOS

Para investigar la primera pregunta de la hipótesis decidimos usar la técnica de microarreglos. Las listas de posibles mensajeros regulados se analizaron con la herramienta *DAVID bioinformatics* para identificar vías de señalización que estuvieran enriquecidas con mensajeros regulados, especialmente aquellos que se han identificado como genes blanco de mSin3B. Para confirmar los cambios en la transcripción de dichos mensajeros usamos la técnica de RT-PCR.

### Cultivo de células N1E-115

La línea celular N1E-115 fue establecida por T. Amano, E. Richelson y M. Nirenberg en 1971, los viales de células fueron conservados en nitrógeno líquido, posteriormente fue descongelado en baño de agua a 37°C. El descongelamiento se llevó a cabo rápidamente, aplicando alcohol al 70% antes de abrirlo para evitar cualquier tipo de contaminación, en adelante las condiciones de asepsia fueron estrictas, trabajando en campana de extracción con flujo laminar, previa descontaminación con luz UV.

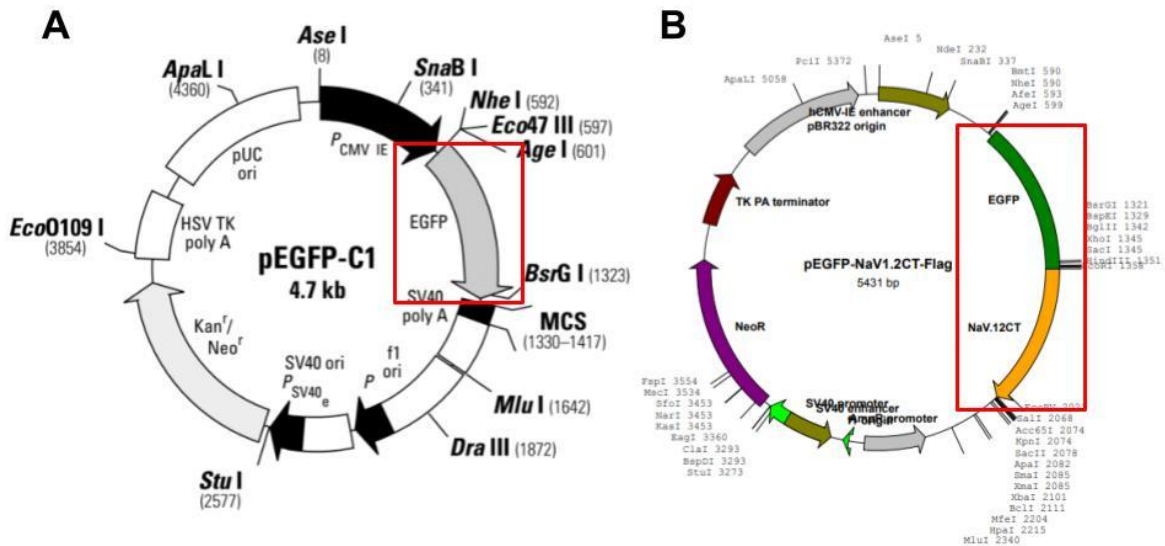
Se transfirió el contenido del frasco a un tubo de centrifugación con 9 mL de medio de cultivo completo, el cual consiste en medio DMEM (*Dulbecco 's Modified Eagle Medium*; Gibco® No. De cat. 31600-026) suplementado con suero bovino fetal al 10% gibco®, penicilina (100 U /ml), estreptomina (100 mg / ml) Gibco® y L-glutamina (4 mM) Gibco® y baja glucosa (5.5mM), se centrifugó a 125 fuerzas g durante 5 minutos, posteriormente, se resuspendieron las células en medio de cultivo, y se transfirieron a un frasco de cultivo celular de 75 mm<sup>2</sup>, este es llamado “cultivo madre” a partir del cual se desprenden subcultivos denominados “pasajes”, con números consecutivos e irrepetibles que indican la cantidad de veces que ha sido tripsinizado y re-sembrado el cultivo, el frasco se mantuvo en incubadora (Revco Elite RCO3000T-5-ABC *Forced-Air* CO<sub>2</sub> Incubator) a 37°C, con una densidad de siembra inicial de 400,000 células en cada pasaje, por otro lado, se emplearon placas de 10cm<sup>2</sup>, en cada una se sembraron 1.5x10<sup>6</sup> células, las cuales fueron transfectadas y a partir de las cuales se obtuvo el ARN empleado para el experimento de microarreglos y RT-PCR.

Se ha sugerido llevar a cabo los experimentos en los pasajes más tempranos debido a que la senescencia podría modificar variables que afectan nuestros resultados. Las células usadas en nuestros experimentos se obtuvieron entre los pasajes 3 y 20.

## **Transfección**

La transfección usada en este trabajo emplea un vector o plásmido, el cual transporta la secuencia del fragmento de interés. Este método confiere una alta eficiencia en la incorporación de genes y una baja citotoxicidad (Jun-ichiro y Yasuhiko, 2008). Existen 2 maneras para transfectar un vector, uno de ellos es a través de métodos químicos como la lipofección o métodos físicos como la electroporación y microinyección. El principio técnico de los métodos químicos se basa en las cargas eléctricas lo cual permite la interacción con la membrana celular, por otro lado, los métodos físicos se basan en herramientas que incorporen de forma mecánica ácidos nucleicos en el núcleo celular (Jun-ichiro y Yasuhiko, 2008), en este caso la transfección se basó en el método publicado por (Longo *et al.*, 2012), empleando clorhidrato de polietilenimina lineal grado transfección de 40,000 kDa (PEI MAX, Polysciences, Inc.). La solución de trabajo se preparó diluyendo 1 mg de clorhidrato de polietilenimina en 1 mL de agua destilada y ajustando la solución a pH 7 con HCl.

Las células transfectadas con el plásmido pEGFP-C1 fueron consideradas grupo control, cabe resaltar que se eligió este plásmido principalmente por que codifica para la proteína verde fluorescente, lo cual permite observar la distribución dentro de la célula, el grupo tratado consistió en células transfectadas con este plásmido modificado con el fragmento CT del  $\text{Na}_v1.2$  el cual codifica la proteína quimérica pEGFP- $\text{Na}_v1.2\text{CT}$ . El procedimiento se llevó a cabo 24h después de la tripsinización y resiembra.



C

**MVSKGEELFTGVVPIVLVDGVDVNGHKFSVSGEGDATYGLTLKFICT**  
**TGKLPVPWPTLVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIF**  
**FKDDGNYKTRAEVKFEKFDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHN**  
**VYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQNTPIGDGPVLLPDNH**  
**YLSTQSALS KDPNEKRDMVLEFVTAAGITLGMDELYKSGLSRAQASN**  
**SSVATEESAEPLEDDFEMFYEVWEKFDPDATQFIEFCKLSDFAAALDPP**  
**LLIAKPNKVQLIAMDLPMVSGDRIHCLDILFAFTKRVLGESGEMDALRIQ**  
**MEERFMASNP SKVSYPITTTTLKRKQEEVSAIVIQRAYRRYLLKQVKKV**  
**SSIYKDKGKEDEGTPIKEDIITDKLNENSTPEKTDVTPSTTSPPSYDSV**  
**TKPEKEKFEKDKSEKEDKGDIRESKKDYKDDDDKCRRYRGPGIHRI\***

**Figura 5.** (A) plásmido pEGFP-C1, (B) plásmido modificado con la secuencia que codifica para la proteína quimérica entre la proteína verde fluorescente y el carboxilo terminal del Na<sub>v</sub>1.2, (C) secuencia de aminoácidos correspondiente a la proteína verde fluorescente (verde), Na<sub>v</sub>1.2CT (naranja) y una etiqueta FLAG (azul). Los aminoácidos restante (negro) corresponden al plásmido hasta el codón de terminación.

Las células transfectadas fueron observadas en fase de transiluminación y de fluorescencia empleando un microscopio invertido de fluorescencia marca Nikon eclipse TE300, con una lámpara de mercurio de súper alta presión Nikon HB-10103 AF, se empleó una exposición de 1/15 y 2" respectivamente, con un aumento de 10x. Se tomaron 3 campos por condición, se realizó una foto documentación y las imágenes se analizaron con el software ImageJ, para realizar el conteo de células transfectadas y así calcular el porcentaje de transfección.

## **Extracción de ARN**

48 hrs después de la transfección se retiró el medio DMEM, se lavaron los pozos con 1ml de PBS 1X y se retiró, posteriormente se agregó 1ml de TRIzol (Invitrogen, 15596026), éste es un reactivo desnaturalizante con base fenol-cloroformo, el cual conserva los ácidos nucleicos debido a que contiene tiocianato de guanidina que funciona como desnaturalizante de proteínas, y adicionalmente actúa como inhibidor de ADNasas y ARNasas, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante, se agregaron 200µL de cloroformo grado molecular, se agitó vigorosamente 15s, la mezcla se incubó durante 2 min y se centrifugó a 14,572 RCF por 15 min a 4°C. Con ayuda de una micropipeta se extrajo la fase acuosa, sin perturbar la fracción fenólica la cual contiene ADN y proteínas, se colocó en otro tubo y se agregó el mismo volumen de isopropanol grado molecular, se incubó 10 min y se centrifugó a 14,572 RCF durante 10 min a 4°C, posteriormente se decantó el sobrenadante.

En este paso ya se puede apreciar una pastilla correspondiente al ARN precipitado, se agregó 1 ml de etanol 70% grado molecular para lavar, se centrifugó a 8,331 RCF durante 5 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y el resto de etanol se evaporó en campana de flujo laminar (5-10 min), finalmente se resuspendió la pastilla en 50 µL de agua libre de ARNasas.

## **Integridad y Concentración**

Para verificar la integridad y calidad del ARN se empleó el protocolo de electroforesis en gel de agarosa al 1% con *buffer* Tris-Ácido Acético-EDTA (TAE). Las muestras de ARN se desnaturalizaron a 95°C en buffer de carga 2X (95% formamida, 0.025% SDS, 0.025% azul de bromofenol, 0.025% xylene cyanol FF, 0.025% bromuro de etidio, y 0.5 mM EDTA) la muestra se separó durante 60 min, a 85 V empleando bromuro de etidio (BrEt), como marcador fluorescente.

La cuantificación de concentración y pureza se realizó en un espectrofotómetro de micro volúmenes NanoDrop™ One/One Cat: ND-ONE-W, empleando un volumen de 1µl, la razón A260/A280 correlaciona la concentración de proteínas y ácidos nucleicos en una muestra, y es preferente un cociente con valor mayor a (>1.8) lo cual indica baja concentración de proteínas.

## Microarreglos

Para conocer el cambio en la expresión se empleó la tecnología de microarreglos. El microarreglo consiste en varias secuencias de ADNc adheridas a un sustrato sólido (chip), donde cada punto (*spot*) contiene varias copias de una misma secuencia de ADN que representa una especie diferente de ARNm y básicamente un gen. El microarreglo que usamos fue diseñado por el Instituto de Fisiología Celular y representa cerca de 22 mil genes de ratón (Chip M22K). Cuando la muestra marcada se hibrida con el microarreglo, cada sonda se une a su secuencia complementaria. Las sondas que no encuentran su ADN complementario o se encuentran en exceso son removidas mediante una serie de lavados. Entre mayor sea el número de copias de un ADNc marcado, la fluorescencia del spot correspondiente será mayor. El cambio en abundancia relativa dentro de muestras individuales proporciona información sobre vías de señalización y cambios en procesos celulares durante el curso de una enfermedad o condición particular (Mirnics y Pevsner, 2014). Esta técnica se llevó a cabo en colaboración con la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Las muestras fueron etiquetadas con dos marcadores fluorescentes: Cy3 para el control y Cy5 para el tratamiento. El colorante Cy3 emite una coloración amarillo-verdoso, es excitado a 550 nm y emite a 570 nm, mientras que el colorante Cy5 es excitado a 650 nm y emite fluorescencia a 670 nm.

Posteriormente se empleó el paquete *GenArise Microarray Analysis Tool*, (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/pdfs/genArise-methodology.pdf>), diseñado en el lenguaje de programación R, que permite realizar el análisis de expresión diferencial de genes de microarreglos. Previo a este análisis, dicho software realiza transformaciones en los datos para eliminar mediciones de baja calidad, ajustar la intensidad de medición y así facilitar comparaciones (Gómez-Mayén *et al.*, 2006).

## Corrección de fondo

Consiste en restar los valores de lectura fondo de Cy3 (control) de los valores de lectura de primer plano de Cy3, y la lectura de fondo correspondiente a Cy5 (tratamiento) de la lectura de primer plano de Cy5, esto para cada punto en el microarreglo.

## Valor de R

Calcula la relación de expresión diferencial logarítmica, esta relación es representada por  $R = \log_2(\text{Cy5}) - \log_2(\text{Cy3})$ , GenArise usa logaritmos de base 2 por lo que la relación es en unidades de cambio doble (*2-fold change*).

## Filtrado por intensidad

Con el fin de eliminar aquellos puntos donde la lectura de primer plano se acercase a su lectura de fondo correspondiente, el valor de lectura de primer plano tanto para Cy3 como para Cy5 debe ser mayor a dos desviaciones estándar con respecto a los valores de lectura de fondo.

## Selección de expresión diferencial de genes

El objetivo de GenArise es identificar cuáles de los genes muestran buena evidencia de ser expresados diferencialmente. Esta función identifica genes expresados diferenciales calculando un Z-score dependiente de la intensidad. Se emplea un algoritmo para obtener la media y la desviación estándar dentro de una ventana que rodea cada punto de datos, y definimos un Z-score donde Z mide el número de desviaciones estándar de un punto de datos que es la media, esto resulta en una lista de genes que se sobre expresan, para fines prácticos en adelante se abrevia como UP y también una lista de genes que disminuyen su expresión, la cual se abrevia como DOWN.

$$Z_i = (R_i - \text{media}(R)) / \text{sd}(R)$$

Donde  $Z_i$  es el valor de Z-score de cada elemento,  $R_i$  es la relación logarítmica de cada elemento, y  $\text{sd}(R)$  es la desviación estándar de la relación logarítmica.

Con este criterio, los elementos que presentan un Z-score  $> 2$  desviaciones estándar son genes expresados diferencialmente de manera significativa (Gómez-Mayén et al., 2006).

## **Análisis comparativo en bases de datos**

La lista de genes expresados diferencialmente resultante del análisis estadístico hecho a la salida de los experimentos de microarreglos fue analizada con recursos en línea, los cuales permitieron conocer las agrupaciones funcionales, y sus anotaciones dependiendo de su actividad biológica.

El centro nacional para la información biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) contiene catálogos completos generados a partir de una colección de acceso abierto, anotada y seleccionada de secuencias de nucleótidos (ADN, ARN), esta colección es llamada base de datos de secuencias de referencia (RefSeq) la cual proporciona un solo registro para cada molécula biológica (ADN, ARN, Proteína) de los principales organismos que van desde virus hasta eucariotas. Contiene las secuencias de referencia en la base de datos GenBank.

Las herramientas *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) aglomera identificadores de genes, proteínas específicas de especies y sus anotaciones a partir de una variedad de recursos genómicos públicos, por ejemplo, *NCBI*, *Uniprot*, *GO*, *KEGG*, entre otros, enriqueciendo en gran medida el nivel de información biológica disponible para un gen determinado. Dentro de esta plataforma empleamos la herramienta *Gen ID conversion tool*, la cual comparó las listas de mensajeros UP Y DOWN con la colección para *Mus musculus* de la RefSeq, posteriormente la herramienta *Functional Annotation* nos permitió comparar nuestras listas con información de la *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG por sus siglas en inglés) y de esta manera identificamos varias vías de señalización enriquecidas con los genes que mostraron una expresión diferencial en el microarreglo.

Finalmente, empleamos una herramienta en línea llamada *Harmonizome*, desarrollada por (Rouillard *et al.*, 2016), la cual consiste en una base de datos generada a partir de experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), así como la secuenciación de ésta (ChIP-Seq), diseñados para identificar blancos de varias proteínas relacionadas con la transcripción, entre ellos mSin3B, el recurso en línea se puede consultar en la siguiente liga: [https://maayanlab.cloud/Harmonizome/gene\\_set/SIN3B/CHEA+Transcription+Factor+Targets](https://maayanlab.cloud/Harmonizome/gene_set/SIN3B/CHEA+Transcription+Factor+Targets). En esta base se encontraron 4020 genes blanco de Sin3B y se cruzó la información con la salida del microarreglo. Así mismo consultamos la base de datos [www.chip-atlas.org](http://www.chip-atlas.org), donde se buscaron genes blancos de Sin3B en humanos (hg38 y hg19) y ratones (mm9 y mm10), donde se enlistan 6200 genes.



## **Diseño de cebadores**

El diseño de oligonucleótidos o cebadores se basó en el número de identificación de la secuencia de nucleótidos de cada mensajero de interés, posteriormente realizamos un alineamiento de secuencias de tipo local en busca de genes homólogos con ayuda de la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), en este caso seleccionamos secuencias correspondientes a ratón, posteriormente se definió la longitud de los cebadores, en este caso 20 nucleótidos, la tabla 1 enlista las secuencias de cada cebador, de igual forma se definió el tamaño esperado del amplicón <200 pb, determinamos que el producto abarcara los últimos dos exones en busca de mensajeros maduros, también definimos la temperatura mínima, óptima y máxima, en este caso (57°C - 60°C - 63°C), una vez que tuvimos propuestas preliminares seleccionamos aquella con una proporción de Guaninas y Citosinas de entre 50% y 60%, finalmente, la síntesis de estos cebadores se llevó a cabo en el instituto de biotecnología (IBt) de la UNAM.

Nombre	Secuencia	Tamaño	Amplicón (pb)
mIl11 FWDsq	TAC TCC GCC GTT TAC AGC TC	20	182 pb
mIl11 REVsq	CTT TAA CAA CAG CAG GCC CC	20	
mStam1 FWDsq	CCC AAG CTT CTT ACC CGA AT	20	189 pb
mStam1 REVsq	AGT TTG GCA CCT GGG ACA TA	20	
mIL6ra FWDsq	AAG ACT CTG CCA ACC ACG AG	20	142 pb
mIL6ra REVsq	CAG AGA AGC AAC CCA AAC GC	20	
mTyk2 FWDsq	CTG CTG GAA CGA GGA GAG AG	20	142 pb
mTyk2 REVsq	CCT GTG CTG TCT GGA GGA TG	20	
mSocs2 FWsq	ACA GGA TGG TAC TGG GGA AG	20	137pb
mSocs2 RVsq	CCA GCT GAC GTC TTA ACG GA	20	

**Tabla 1.** Secuencias de cebadores diseñados para amplificar Socs2, Stam1, Tyk, Il11, Il6ra, tamaño del primer y tamaño del amplicón esperado.

## RT

El protocolo de retrotranscripción se llevó a cabo con el kit que contiene la enzima *GoScript reverse transcriptase* (Promega, Cat #A5003). Primero se llevó a cabo la mezcla de 1µg de ARN total de cada una de las 3 muestras del grupo control (pEGFP-C1) y 4 muestras del grupo transfectado con pEGFP-Na<sub>v</sub>1.2CT, se adicionaron oligo dT para garantizar la retro transcripción de mensajeros maduros, y agua libre de ARNsas, esta mezcla se calentó a 70°C por 5 min, inmediatamente se colocó en hielo por 5 minutos y se centrifugó, posteriormente se mezcló el buffer GoScript 5X, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs 10 mM y la enzima, se realizó la alineación a 25°C durante 10 minutos y la extensión a 42°C por una hora, finalmente la enzima se inactivó por un periodo de 15 min a 70°C, cada reacción se llevó a cabo con su respectivo control negativo sin enzima RT.

## PCR punto final

Este experimento se llevó a cabo con el *DreamTaq DNA polymerase* (Thermo scientific, No. catálogo MAN0012036), empleando los 5 juegos de cebadores previamente diseñados (Il6ra, Il11, Stam1, Socs2, Tyk2) Tabla 2. Como control endógeno, se probó ARN 18S (R18S) y succinato deshidrogenasa (SDH), finalmente se seleccionó R18S, las condiciones iniciales de la reacción fueron, Desnaturalización: 95°C por 10 min, 95°C por 30s; Alineación: 62°C/ 66°C por 30s; Extensión: 72°C por 30s, durante 40 ciclos, con una extensión final a 72°C por 10 min y finalmente una disminución a 4°C al infinito.

Una vez que se lleva a cabo la reacción, los productos de PCR (25 µl) se separaron en gel de agarosa al 1.2% con *buffer* Tris-Ácido Acético-EDTA (TAE), se agregó 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. De esta manera, empleando un marcador de peso molecular *GeneRuler de 50 pb DNA Ladder* (Thermo Scientific) y conociendo el tamaño del amplicón, se identificaron las bandas esperadas. Los geles se visualizaron con transiluminador de luz ultravioleta y se obtuvo la imagen con un fotodocumentador BIO-RAD, usando el sistema de procesamiento y de análisis Image Lab 3.0 de (BIO-RAD). Para constatar que los productos de PCR fueran efectivamente las amplificaciones de ADNc y no de contaminación con ADN genómico, se incluyeron controles negativos, los cuales carecen de enzima reversa transcriptasa.

## **qRT-PCR**

El protocolo se llevó a cabo usando el kit *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Mix (2x)* (Thermo Scientific, no cat. K0221), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La enzima *Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase* que contiene el kit es inactiva a temperatura ambiente, lo que evita la extensión de cebadores o dímeros de cebadores proporcionando una mayor especificidad de amplificación de ADN. En cuanto al buffer, se ha optimizado ya que contiene KCl y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para proporcionar una alta especificidad de cebador.

SYBR Green I es un colorante que al intercalarse al ADN de doble cadena emite una señal fluorescente. En la PCR, el ADN se acumula y la señal aumenta proporcionalmente a la concentración de ADN. Los máximos de excitación y emisión de SYBR Green I están en 494 nm y 521 nm, respectivamente, que son compatibles con el uso en cualquier termociclador en tiempo real

El colorante pasivo ROX sirve como referencia interna para la normalización de la señal fluorescente de SYBR Green. ROX permite la corrección de la variación entre pozo y pozo debido a imprecisiones de pipeteo y fluctuaciones de fluorescencia. La presencia de ROX no interfiere con la PCR y tiene un espectro de emisión diferente (los máximos de excitación/emisión están en 580 nm/ 621 nm, respectivamente) en comparación con SYBR Green.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador C-1000 (BIO-RAD), acoplado a un módulo de lectura óptica, modelo CFX96, las condiciones de la reacción fueron, Desnaturalización: 95°C por 10 min, 95°C por 30s; Alineación: 62°C/ 66°C por 30s; Extensión: 72°C por 30s, durante 40 ciclos, con una extensión final a 72°C por 10 min y finalmente una disminución a 4°C al infinito.

## **Análisis Estadístico**

El análisis estadístico permitió determinar las diferencias y significancias entre la expresión del control y los mensajeros de interés, la significancia se determinó con prueba T de Student, mientras que el cambio en la expresión relativa se determinó con el método  $\Delta\Delta\text{CT}$  propuesto por Livak y schmittgen en 2001.

## RESULTADOS

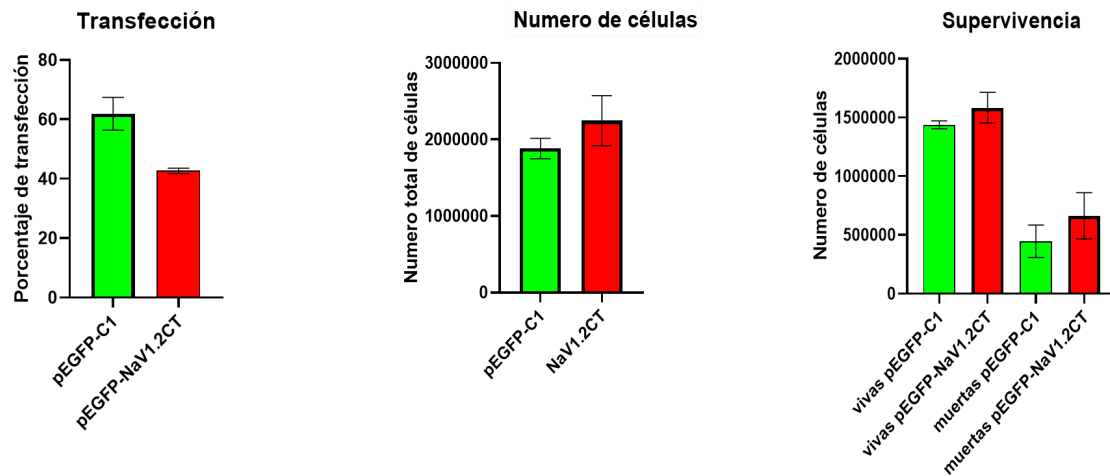
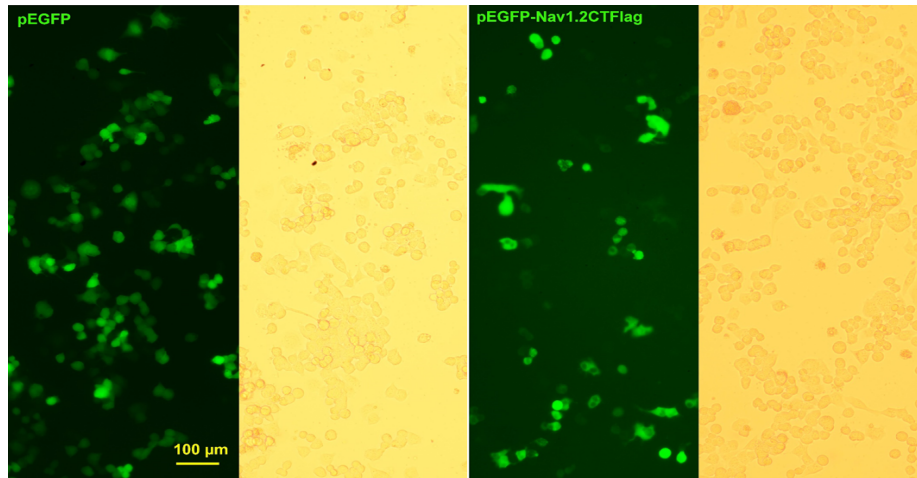
### Calibración de la transfección (ADN: PEI)

Previamente en nuestro laboratorio habíamos determinado la densidad de siembra celular en las placas de cultivo de 6 pozos, y encontramos que la mejor eficiencia de transfección con el plásmido control se obtenía usando una relación ADN: PEI 1:4, se eligió esta relación debido a que una concentración más alta de PEI resultó en mayor número de muerte celular. Usando estas mismas condiciones, con el plásmido pEGFP-Nav1.2CT, obtuvimos un porcentaje de transfección en la condición control (pEGFP-C1) del 61.87%, mientras que en células transfectadas con pEGFP-Nav1.2CT este porcentaje fue de 42.67%, esto posiblemente se relaciona con el incremento del tamaño del ADN. Hornstein y cols. (2016), observaron en células HeLa, que aun con la incorporación del mismo número de moles de vector, lo cual resulta en el mismo número de moléculas de ADN por célula, la expresión de las proteínas codificadas en el plásmido era menor, mientras mayor era el tamaño del vector. Más aún, este patrón se ha visto constante con otras técnicas de transfección, incluyendo los complejos formados por lípidos catiónicos y ADN, llamados lipoplexos (Kreiss *et al.*, 1999), así como con la electroporación (Lesueur *et al.*, 2016).

En este sentido, en nuestros resultados no se observa un cambio estadísticamente significativo en el número de células vivas, muertas ni totales en el cultivo, aunque la supervivencia de la línea celular en los cultivos transfectados con el plásmido pEGFP-Nav1.2CT fue ligeramente mayor, tampoco resultó significativo (Figura 6). Estos datos fueron obtenidos 48 horas post-transfección, por lo que resulta interesante la idea de un experimento longitudinal para determinar si este patrón se mantiene o cambia.

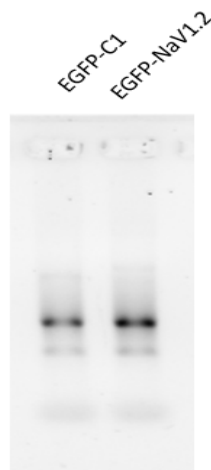
### Extracción, Integridad y Concentración del ARN

Se obtuvieron 3 muestras de ARN de células N1E-115 transfectadas con el plásmido pEGFP-C1 y 4 muestras de las células transfectadas con el pEGFP-Nav1.2CT, las bandas ribosomales 28S y 18S indican la integridad de este tipo de ácidos nucleicos, una relación 2:1 (28S:18S) de la intensidad entre estas bandas representan buena calidad de la muestra, como se puede apreciar en la imagen representativa, correspondiente a la Figura 7, el pico de absorción de ácidos nucleicos como lo es el ARN se da con longitudes de onda de 260 nm, y el pico máximo de lectura de proteínas se da con longitudes de 280 nm, por lo que el cociente A260/A280, permite conocer la concentración y pureza de las muestras.



Condición	pEGFP	pEGFP-Nav1.2CT	P-Value
Transfección (%)	66.81 ± 5.534	42.67 ± 0.8914	0.004
Células vivas	1,437,500 ± 33,072	1,583,333 ± 130,104	0.133
Células muertas	445,833 ± 137,689	662,500 ± 196,453	0.193
Células totales	1,883,333 ± 133,658	2,245,833 ± 326,040	0.149

**Figura 6.** Imagen superior, campo obtenido con microscopio invertido de fluorescencia de la línea N1E115 transfectada con el pEGFP-C1 y con pEGFP-Nav<sub>v</sub>1.2CT. Gráfica inferior izquierda, porcentaje de transfección de células NIE-115, Gráfica inferior central, Número de células. Gráfica inferior derecha, supervivencia en la línea NIE-115 (n=3).



Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	2.27	2.38
Cociente A260/A280	1.87	1.86

**Figura 7.** Gel de agarosa 1% con muestras ARN obtenidas de célula N1E115 transfectadas con el plásmido control (pEGFP-C1) o con pEGFP-Na<sub>v</sub>1.2CT. En la tabla se muestra la concentración de ARN y la relación A260/ A280.

Microarreglo	Número total de genes UP	Número total de genes Down
1	400	544
2	244	313

**Tabla 2.** Total de mensajeros regulados en 2 experimentos de microarreglos (*UP-DOWN*).

### **Análisis bioinformático del microarreglo, *KEGG* y *Harmonizome*.**

A partir de este análisis, se recibieron dos archivos por cada experimento, que contenían las listas de genes que mostraron una tendencia a aumentar (genes *UP*) o disminuir (genes *DOWN*) su expresión. La tabla 2 contiene la suma de mensajeros cuya expresión fue diferente en las células transfectadas con el pEGFP-Na<sub>v</sub>1.2 CT comparado con aquellas transfectadas con pEGFP-C1 en cada experimento de microarreglo.

Para tratar de establecer relaciones funcionales entre los mensajeros regulados accedimos a la Enciclopedia de Kioto para Genes y Genomas (*KEGG pathway maps*). Para ello introdujimos los datos de los genes regulados, según el análisis proporcionado por el IFC-UNAM, a la plataforma *DAVID bioinformatic analysis tool*. Como resultado obtuvimos una serie de vías de señalización con las cuales se han asociado varios de los genes encontrados en el experimento de microarreglo (Tabla 3). Entre dichas vías, tenemos por ejemplo la vía de Notch, la vía de control de células madre pluripotenciales, la vía TGF- $\beta$  y la vía de señalización JAK-STAT, todas las cuales se relacionan con el control del ciclo celular y con cáncer. De entre estas posibles vías de señalización, seleccionamos la vía JAK-STAT. Dentro de esta vía 3 mensajeros (Stam1, Il 11, Tyk2 ) se encontraban regulados a la baja en los 2 experimentos de microarreglos, mientras que Socs2 e Il6ra, se encuentran regulados en uno de ellos. Por otra parte, ya que una de las premisas de nuestra hipótesis es que el Na<sub>v</sub>1.2CT puede interactuar con proteínas como el mSin3B, también investigamos cuáles de los genes enriquecidos en la vía de señalización JAK-STAT podrían ser blanco de esta proteína con función transcripcional. Para ello, realizamos una consulta en la base de datos *Harmonizome*, y en la base ChIP-Atlas (<https://chip-atlas.org/>), que albergan resultados respectivos de experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), producto de esta búsqueda, encontramos que Socs2, Stam1, Il11 y Tyk2 son blanco mSin3B (Tabla 4).

Cabe señalar que aunque encontramos vías enriquecidas con mayor número de genes dentro de ellas y/o con un p-valor mayor, los mensajeros que se encontraban en estas listas (ej. *Cytokine-cytokine receptor interaction*, *Pathways in cancer*, etc.) no aparecían en más de un experimento. En contraste, en la lista correspondiente a la vía JAK-STAT, 3 de ellos (Il11, Stam1 y Tyk2) se repetían en ambos experimentos.



Category	Term	Count	P-value
KEGG_PATHWAY	Cytokine-cytokine receptor interaction	27	4.2E-04
KEGG_PATHWAY	Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	16	1.1E-03
KEGG_PATHWAY	Th17 cell differentiation	13	2.0E-03
KEGG_PATHWAY	Notch signaling pathway	9	4.3E-03
KEGG_PATHWAY	Basal cell carcinoma	9	5.8E-03
KEGG_PATHWAY	cAMP signaling pathway	19	7.6E-03
KEGG_PATHWAY	Hematopoietic cell lineage	11	7.7E-03
KEGG_PATHWAY	TGF-beta signaling pathway	11	8.3E-03
KEGG_PATHWAY	Hippo signaling pathway	15	8.7E-03
KEGG_PATHWAY	Inflammatory mediator regulation of TRP channels	13	9.4E-03
KEGG_PATHWAY	Adherens junction	9	1.2E-02
KEGG_PATHWAY	Rap1 signaling pathway	18	1.2E-02
KEGG_PATHWAY	Pathways in cancer	36	1.3E-02
KEGG_PATHWAY	Th1 and Th2 cell differentiation	10	1.4E-02
KEGG_PATHWAY	<b>JAK-STAT signaling pathway</b>	<b>10</b>	<b>1.5E-02</b>

**Tabla 3.** Lista de vías de señalización enriquecidas después de la transfección de pEGFP-NaV1.2 CT,

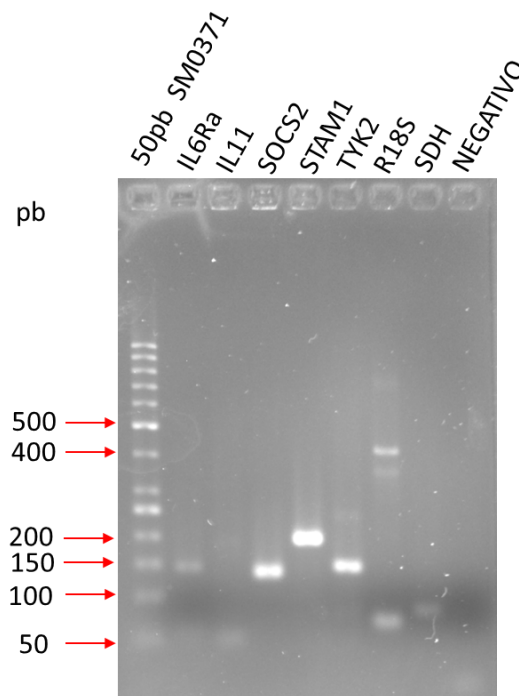
Nombre	Abreviación	NCBI	Z-score	Blanco de complejos formados por mSin3B
Suppressor of cytokine signaling 2	Socs2	NM_007706	-1.61	SI
Signal transducing adapter molecule 1	Stam1	NM_011484	-2.65	SI
interleukin 11	Il11	NM_008350	-2.30	SI
Tyrosine kinase 2	Tyk2	NM_018793	-2.47	SI
Interleukin 6 receptor alpha	Il6ra	NM_010559	-2.07	
Interleukin 2	Il2	NM_008366	-2.20	
Cardiotrophin 1	Ctf1	NM_007795	-2.75	
Colony stimulating factor 3	Csf3	NM_009971	1.7	
Interferon alpha 9	Ifna9	NM_010507	2.9	
Cytokine receptor-like factor 2	Crlf2	NM_016715	1.43	

**Tabla 4.** ARNm regulados en la vía de señalización JAK-STAT de *Mus musculus*. La tabla muestran la abreviación del gen, número de identificador, Z-score promedio, enmarcados en verde aquellos mensajeros regulados de manera positiva y en rojo, aquellos regulados de forma negativa, las veces que su expresión se repitió en los experimentos de microarreglos y en la última columna se indica si el gen coincide dentro de la base de datos *Harmonizome* como blanco de mSin3B.

De esta manera es que elegimos estos 5 mensajeros en busca de verificar por sqRT-PCR si había cambios en el nivel de expresión en respuesta a la expresión heteróloga de la quimera pEGP-Na<sub>v</sub>1.2CT. Para ello diseñamos *primers* o cebadores específicos (ver Tabla 1) e hicimos experimentos de calibración en células transfectadas con el control, empleando PCR punto final, antes de iniciar los experimentos de sqRT-PCR.

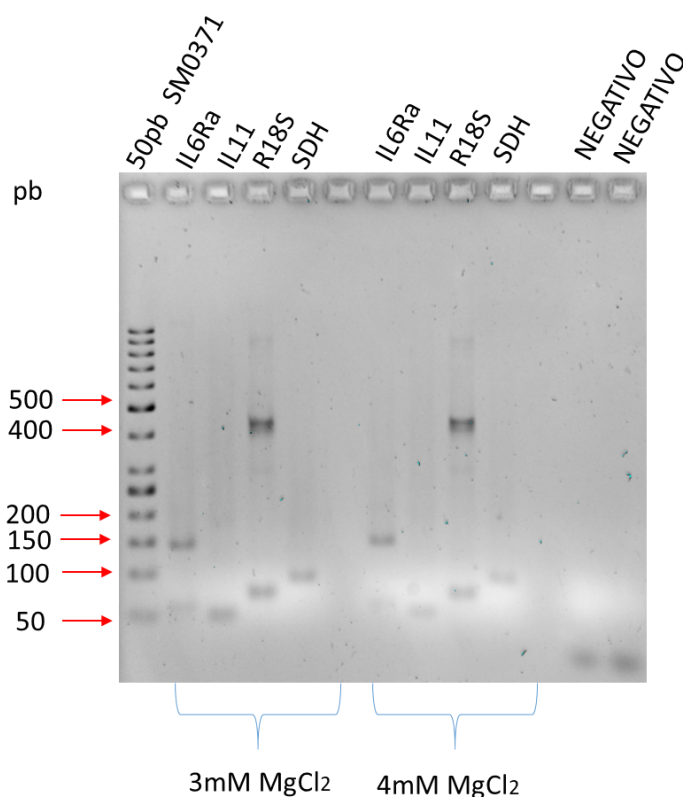
### PCR (calibración de condiciones de amplificación)

Las condiciones ideales vienen detalladas en el manual adjunto al kit de la enzima polimerasa y el procedimiento es descrito en los métodos, todos los experimentos se realizaron con 40 ciclos de amplificación, el primer intento se llevó a cabo con la concentración de fábrica de MgCl<sub>2</sub> del kit que es de 2.5mM y 62°C como temperatura de alineamiento, se probaron 2 controles internos, R18S y SDH, este último no tuvo una amplificación eficiente, de la misma forma en el caso de Il6ra e Il 11, por otro lado Socs2, Stam1 y Tyk2, amplificaron de forma muy eficiente en estas condiciones, para verificar el tamaño de cada banda en el gel, empleamos un marcador de 50 pb. Para determinar que la amplificación proviene de ADNc y no de ADN genómico se incluyeron controles negativos, es decir, sin transcriptasa reversa y en efecto no se observó ningún indicio de amplificación Figura 8.



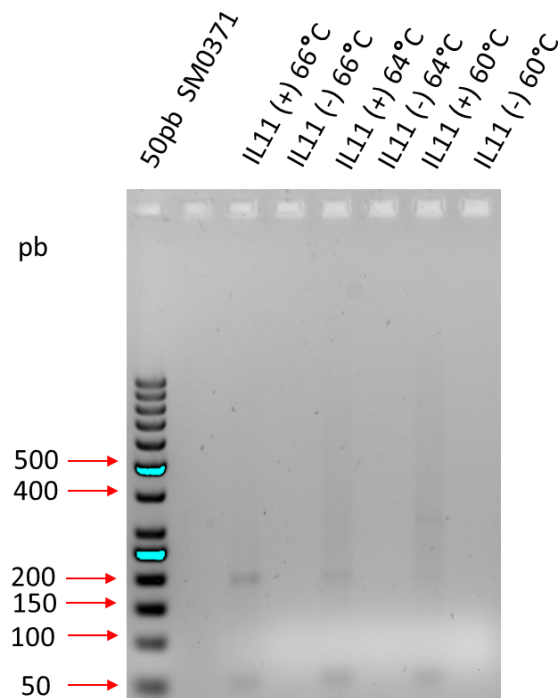
**Figura 8.** Gel de agarosa al 3% con Buffer TAE, BrEt 0.5ug/ml, productos de PCR punto final, se emplean 5 uL del producto, 2 uL de Buffer Blue juice 10X, y 3 uL de H<sub>2</sub>O, sometido a una corriente de 85V durante 1hr.

Posteriormente nos dimos a la tarea de encontrar la variable que permitiese mejorar la amplificación de IL6ra, R18S, SDH pero especialmente IL11, por lo que ajustamos la concentración de MgCl<sub>2</sub>, a 3mM y 4mM siguiendo las mismas condiciones de temperatura de desnaturalización, alineación y extensión. El gel se observa en la Figura 9, aparentemente SDH no resultó ser un buen control interno, pues no se logró amplificar en ninguna condición, en el caso de IL6ra y R18S ambas condiciones parecen ser favorables para su amplificación, sin embargo IL11 parece tener una mejor eficiencia con una concentración de 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, por lo que se eligió esta condición para los experimentos subsecuentes, en cuanto al control negativo, no se observó amplificación



**Figura 9.** Gel de agarosa al 3% con *Buffer* TAE, BrEt 0.5ug/ml, productos de PCR punto final, IL6Ra, IL11, R18S y SDH, se emplean 5 uL del producto, 2 uL de Buffer Blue juice 10X, y 3 uL de H<sub>2</sub>O, sometido a una corriente de 85V durante 1hr.

Una vez ajustada la concentración de magnesio, probamos una curva de temperatura de alineamiento en este caso solo para Il11, con 2 grados por debajo de la T° empleada en el último experimento (62°C) y dos condiciones con 2 grados diferencia por arriba es decir 64°C y 66°C, encontramos que la mejor amplificación se logró a 66°C con una concentración de 3mM de magnesio, Figura 10. Adicionalmente realizamos el mismo experimento para Il6ra (dato no mostrado) y encontramos que amplifica con mejor eficiencia en estas condiciones, lo cual nos permitió establecer los grupos y condiciones para llevar a cabo la PCR en tiempo real, con R18S como control interno para ambas, sin embargo, los resultados observados de PCR punto final sugieren que Socs2, Stam1 y Tyk2 tienen mayor representación en comparación con Il6ra e Il 11.



**Figura 10.** Gel de agarosa al 3% con *Buffer* TAE, BrEt 0.5ug/ml, productos de PCR punto final, a distintas temperaturas de alineamiento para Il11, se emplean 5 uL del producto, 2 uL de Buffer Blue juice 10X, y 3 uL de H2O, sometido a una corriente de 85V durante 1hr.

## sqRT-PCR

Una vez que se establecieron las condiciones ideales para cada juego de primers, se conformaron dos grupos, que difieren por la temperatura de alineamiento ( $T_m$ ) de 62°C para Socs2, Stam1 y Tyk2 con R18S como control, por otro lado, Il6ra, Il 11 y R18S, con una  $T_m$  de 66°C.

En la (Figura 11, inferior derecha) conocida como Whisker plot o gráfica de campanas se puede observar la expresión de cada mensajero relativa al control R18S, el cual es un promedio del  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , a partir de 4 muestras de ADNc correspondientes a la condición pEGFP-Nav1.2CT, los experimentos se llevaron a cabo por triplicados, esta gráfica se apoya de la Tabla 5 donde se puede observar los valores numéricos del promedio mencionado así como su desviación estándar, y el valor obtenido del análisis T de Student, donde el P-valor nos indica la significancia estadística del cambio observado.

Por lo consiguiente, los resultados de este experimento nos indican que Socs2 tuvo un aumento en su expresión con respecto al control mostrando un aumento de 1.7 veces  $\pm 0.34$  ( $P= 0.0163$ ), Stam1 también mostró un aumento en su expresión de 2.16 veces  $\pm 0.33$  ( $P= 0.0020$ ), en el mismo sentido, observamos que Tyk2 aumenta su expresión 2.11 veces  $\pm 0.26$  ( $P= 0.0008$ ), por otro lado Il6ra presentó un aumento mínimo en su expresión, contabilizando un promedio de 1.18 veces  $\pm 0.63$ , sin embargo el análisis estadístico indica que este cambio no es significativo ( $P= 0.6450$ ), en el caso de Il11 su expresión disminuye 0.52 veces  $\pm 0.39$  ( $P= 0.0931$ ), pero de la misma forma que Il6ra, el cambio no es estadísticamente significativo.

Es importante mencionar que el patrón de expresión en la PCR no coincide con lo observado en los experimentos de microarreglos, pues en los microarreglos Socs2, Il6ra, Il 11, Stam1 y Tyk2 tienen un Z-Score negativo, y en los resultados de PCR tiempo real se observa un aumento en la expresión, en el caso de Socs2, Stam1 y Tyk2.

ARNm	$2^{-\Delta\Delta CT}$	P-value
Socs2	1.72 ± 0.34	0.0163 *
Stam1	2.16 ± 0.33	0.0020 *
Tyk2	2.11 ± 0.26	0.0008 *
Il6ra	1.18 ± 0.63	0.6450
Il11	0.52 ± 0.39	0.0931

**Tabla 5.** Valor promedio de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  para cada mensajero de interés. Resultados del Análisis de T-Student, con el fin de verificar la significancia estadística del cambio observado de  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , con un (\*) se indican los valores que con significancia (n=4)

ARNm	Tm	pEGFP-C1(n=3)	Na <sub>v</sub> 1.2CT(n=4)
<b>Socs2</b>	<b>62</b>	1.83 ± 0.02	1.76 ± 0.06
<b>Stam1</b>	<b>62</b>	1.76 ± 0.03	1.82 ± 0.04
<b>Tyk2</b>	<b>62</b>	1.72 ± 0.08	1.83 ± 0.05
<b>R18S</b>	<b>62</b>	1.79 ± 0.17	1.87 ± 0.15
<b>Il6ra *</b>	<b>66</b>	1.83 ± 0.07	1.72 ± 0.11
<b>Il11 *</b>	<b>66</b>	1.73 ± 0.08	1.66 ± 0.02
<b>R18S *</b>	<b>66</b>	1.85 ± 0.04	1.75 ± 0.03

**Tabla 6.** Eficiencia de amplificación. Se presentan los resultados como media y desviación estándar. \* la temperatura de alineamiento de la PCR fue mayor.

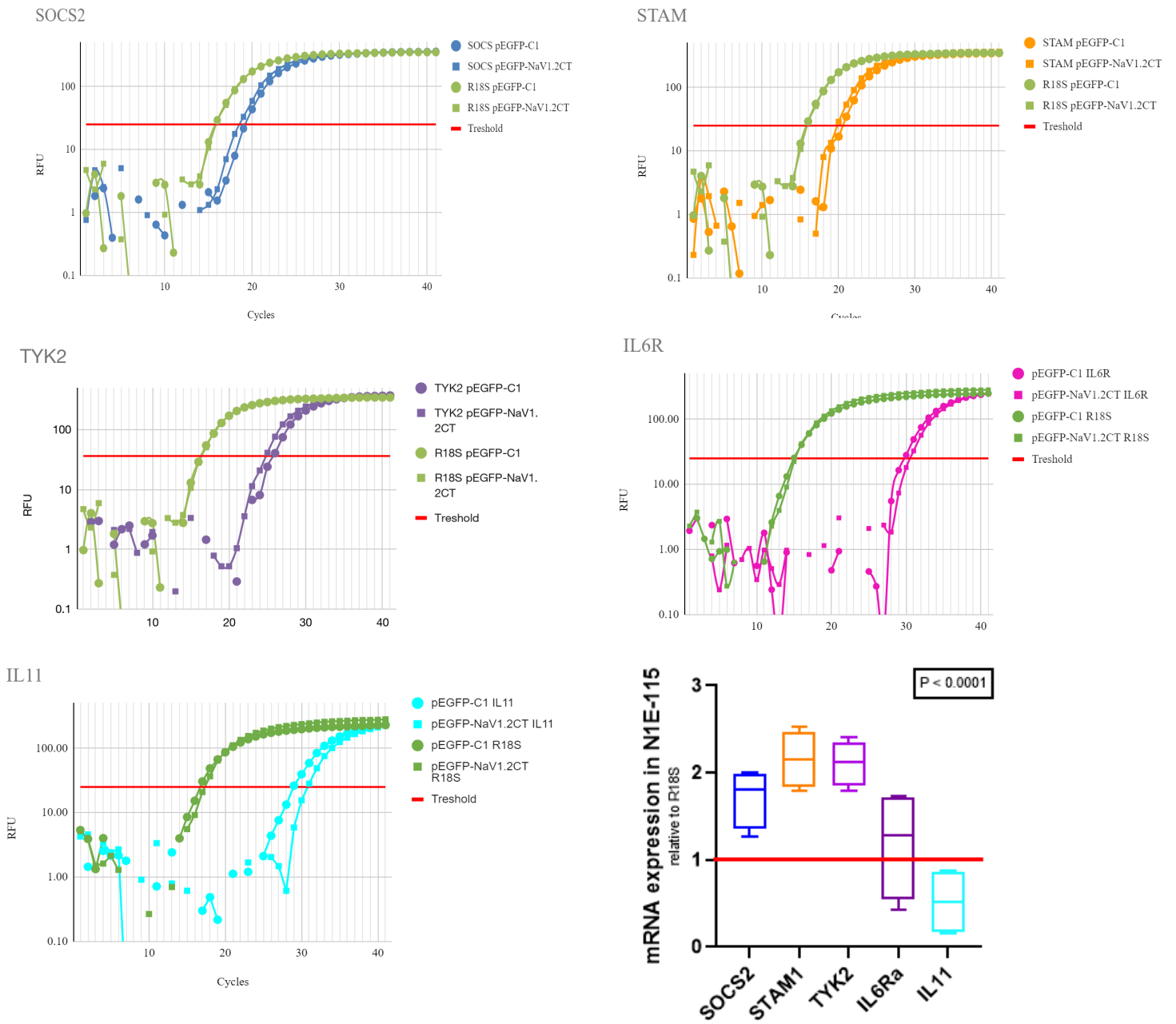
En la Figura 11 se pueden observar las gráficas de amplificación de los 5 mensajeros analizados por PCR en tiempo real. Se grafican las unidades relativas de fluorescencia (URF) contra el número de ciclos, cada curva es el resultado de promediar el valor de las URF de 3 repeticiones de cada ciclo. El valor umbral de fluorescencia fue de 25 URF el cual se encuentra en la fase exponencial para Il6ra e Il 11, en el caso de Socs2, Stam1, Tyk2, el umbral se estableció en 36.5 URF. Para determinar la magnitud del aumento en nuestros experimentos realizamos un análisis tipo  $(1+eff)^{-\Delta CT}$  propuesto por Livak y schmittgen, (2001). Los valores de eficiencia obtenidos en nuestros experimentos se encuentran descritos en la Tabla 6. La abundancia de un mensajero es inversamente proporcional al número de ciclos que necesita para alcanzar el valor umbral, a este valor se le llama ciclo umbral o CT por sus siglas en inglés (*cycle treshold*). Siguiendo este principio se puede observar que en células transfectadas con pEGFP-Na<sub>v</sub>1.2CT Socs2 es el mensajero es más abundante, alcanzando el umbral en el ciclo 18 en comparación con el control (ciclo 19), con una eficiencia de amplificación de  $1.76 \pm 0.06$ .

El caso de Stam1 parece indicarnos que su abundancia es menor a la de Socs2, este alcanza el umbral en el ciclo 20, mientras que el control lo hace en el ciclo 21, para este mensajero el cálculo de la eficiencia de amplificación fue de  $1.82 \pm 0.04$ .

En cuanto a las curvas de amplificación de Tyk2, su abundancia parece ser menor debido a que alcanza el umbral en el ciclo 24, mientras que en el control lo hace en el 25, con una eficiencia de amplificación de  $1.83 \pm 0.05$ .



Finalmente, se observan las curvas representativas correspondientes a Il6ra e Il 11, la abundancia de estos 2 mensajeros es baja, debido a que el umbral para Il6Ra se sitúa en el ciclo 30 en células transfectadas con pEGFP-C1 y en el ciclo 29 para el control, con una eficiencia de  $1.70 \pm 0.14$ , en el caso de Il11 esta alcanza el umbral en el ciclo 31 mientras que en el control alcanza este punto en el ciclo 29 con una eficiencia de  $1.59 \pm 0.06$ , sin embargo como se mencionó previamente el cambio observado en estos mensajeros no es estadísticamente significativo.



**Figura 11.** Curvas representativas de amplificación de *Socs2*, *Stam1*, *Tyk2*, *Il6ra* e *Il 11*, se grafican las unidades relativas de fluorescencia (URF) contra el número de ciclos, escala logarítmica y los datos están normalizados sobre el valor máximo de fluorescencia, en las curvas los cuadros corresponden a la condición tratada con pEGFP-NaV1.2CT, mientras que las curvas marcadas con círculo corresponde a la condición control, la gráfica inferior izquierda corresponde a un Whisker plot, donde se compara la expresión de los mensajeros *Socs2*, *Stam1*, *Tyk2*, *Il6ra* e *Il 11* relativa a R18S (línea roja, = 1).

## DISCUSIÓN

En este trabajo encontramos que la expresión heteróloga del carboxilo terminal del  $Na_v1.2$  promueve un aumento en la expresión de los ARNm de *Socs2*, *Stam2* y *Tyk2* en cultivos de línea celular de neuroblastoma N1E-115.

La acumulación de evidencias tanto de nuestro grupo de trabajo como de otros grupos de investigación, proponen un nuevo papel para los canales de sodio activados por voltaje. Como ya se mencionó en la introducción, es el caso de lo reportado por Onwuli y cols. (2017), quienes documentaron la presencia de una NLS en el asa que une los dominios I-II del  $Na_v1.5$  y la activación del promotor del gen *SCN5A* por este mismo fragmento en células cardíacas, lo que demuestra que la NLS en el asa intracelular, al igual que en el CT de  $Na_v1.2$ , es funcional y sugiere que ambos fragmentos pueden desempeñar un papel en la transcripción, además de que este proceso puede llevarse a cabo en más de un tipo de células eléctricamente excitables. En nuestros experimentos con el fragmento C-terminal del  $Na_v1.2$ , observamos una localización predominantemente nuclear, un cambio estadístico significativo en la regulación de mensajeros en la línea N1E-115, tanto con tecnología de microarreglos, como en PCR tiempo real. En este mismo sentido, datos aportados por House y cols. (2010), provocando la pérdida de función del  $Na_v1.5$  y empleando también la tecnología de microarreglos, encontraron que el silenciamiento de esta isoforma cardíaca reduce la capacidad invasiva de líneas de cáncer de colon, a través de la regulación de una red génica que abarca la señalización Wnt, la migración celular, el desarrollo del ectodermo, la respuesta al estímulo biótico, el proceso metabólico de esteroides y el control del ciclo celular. En nuestro trabajo se encontró regulación ARNm de proteínas de varias vías de señalización relacionadas con estos procesos celulares, más aún, la vía JAK-STAT está directamente relacionada con procesos como la apoptosis, diferenciación y la proliferación.

La regulación génica observada en el presente trabajo, podría ayudar a explicar la importancia de la expresión de  $Na_v1.2$  para el desarrollo del sistema nervioso central, se sabe que la subunidad alfa del  $Na_v1.2$  es la más abundante en regiones como la corteza, hipocampo, estriado y el mesencéfalo. Planells-Cases y cols. (2000) llevaron a cabo una extensa investigación acerca del papel de los canales de sodio y las consecuencias de eliminar la subunidad alfa del  $Na_v1.2$ , con ratones knockout (KO) (*Scn2a<sup>-/-</sup>*), encontraron que los ratones que carecen de esta isoforma sobreviven la etapa fetal, pero mueren en un lapso no mayor a 2 días después del nacimiento. También aportaron evidencias de la fragmentación del ADN en la neocorteza y tronco encefálico de ratones (*Scn2a<sup>-/-</sup>*), así como una serie de cambios celulares indicativos de una apoptosis masiva en estas regiones del sistema nervioso.

Cabe mencionar que no sólo la ausencia de *Scn2a* es letal, los KO de  $\text{Na}_v1.1$  (*Scn1a*<sup>-/-</sup>) presentan ataxia y mueren alrededor del día 15 posnatal (Martin *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007), incluso los ratones heterocigotos, mueren alrededor del día 28. De forma similar, los ratones KO para  $\text{Na}_v1.6$  (*Scn8a*<sup>-/-</sup>), desarrollan ataxia cerebelar y mueren alrededor del día 21 (Burgess *et al.*, 1995). Ahora bien, en todos los casos, los cambios en la excitabilidad neuronal son sutiles, esto debido a que estas 4 isoformas de canales de sodio tienen características electrofisiológicas similares, de esta manera, las demás isoformas presentes compensan la propiedades biofísicas de los canales ausentes (Planells-Cases *et al.*, 2000; Van Wart *et al.*, 2006).

Se sabe también, que el  $\text{Na}_v1.5$  es necesario para el desarrollo normal del corazón, y esta función es independiente al mecanismo canónico de conducción de corriente. Específicamente, en el pez cebra (*Danio rerio*) la introducción de ARN antisentido contra homólogos del  $\text{Na}_v1.5$  (*Scn5laa*, *Scn5lab*) en la etapa de gastrulación reduce la expresión génica de factores clave en células precursoras de cardiomiocitos, tales como *nkx2.5*, *gata4*, *hand2*, así como una teratogénesis en las cámaras cardiacas y el asa cardiaca (Chopra y cols. 2010). Es importante mencionar que al bloquear el  $\text{Na}_v1.5$  con TTX, no se produjo la reducción de los genes antes mencionados, lo que indica que los cambios observados no están relacionados con la actividad eléctrica que desempeña el canal. En conjunto, estas evidencias nos invitan a preguntarnos si el aumento en la expresión de los genes reportados en nuestro trabajo, se debe a una función no canónica para el  $\text{Na}_v1.2$ .

Cabe señalar que, si bien los resultados obtenidos de microarreglos y los de PCR en tiempo real difieren en el sentido en que ocurre los cambios de la expresión de los mensajero, los microarreglos nos permitieron visualizar redes de señalización y centrar nuestros esfuerzos en confirmar dichos cambios en tiempo real. Según una revisión de Draghici y cols. (2006), las evidencias sugieren que para transcripciones relativamente abundantes, la existencia y dirección (pero no la magnitud) de los cambios de expresión pueden detectarse de manera confiable. Sin embargo, es difícil lograr mediciones precisas de los niveles de expresión absolutos y la detección confiable de genes de baja abundancia. De acuerdo a estos autores, los principales problemas parecen ser el diseño subóptimo o la elección de las sondas y algunas anotaciones incorrectas de las sondas, lo que podría generar hibridación cruzada y de esta manera la detección de uno o más transcritos con secuencias similares al transcrito para el cual fue diseñada la sonda. Es posible que algunos de estos factores hayan influido en que, por ejemplo, el número de mensajeros regulados entre los dos microarreglos realizados difiere en un 33%. Aunado a ello, debido al costo del uso de los microarreglos, el número de repeticiones generalmente se limita a una o dos. Por ello, consideramos que la PCR en tiempo real, es una herramienta más precisa y en la cual tenemos mayor capacidad de controlar variables inherentes a la técnica.

A pesar de no tener el mismo sentido de regulación, encontramos que Socs2, Stam2 y Tyk2, tienen cambio significativo en respuesta a la expresión heteróloga del Na<sub>v</sub>1.2. y todos son regulados por mSin3B. Sin embargo, queda mucho por aclarar sobre el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo esta regulación.

Por otro lado, como se mencionó en los antecedentes, sabemos que la señal de localización nuclear, es funcional, por lo que una perspectiva de este trabajo sería emplear técnicas como la inmunoprecipitación de la cromatina, para saber si la interacción de Na<sub>v</sub>1.2CT-mSin3B promueve o interfiere en la unión de mSin3B con los promotores de sus blancos.

### **Generalidades de la vía JAK-STAT**

Las respuestas celulares a un gran número de citocinas y factores de crecimiento están mediadas por una vía de señalización conservada evolutivamente, la *Janus Kinase/ Signal Transducer and Activator of transcription* (JAK/STAT). Dichas respuestas incluyen, por ejemplo: proliferación, diferenciación, migración, apoptosis y supervivencia celular; dependiendo de la señal, el tejido y el contexto celular. La señalización JAK/STAT es esencial para numerosos procesos de desarrollo y homeostasis, incluida la hematopoyesis, el desarrollo de células inmunitarias, el mantenimiento de células madre, el crecimiento de organismos, entre otros (Ghoreschi *et al.* 2009). Dado que las proteínas codificadas por los ARNm que medimos forman parte de la vía de señalización JAK-STAT, en esta sección discutiremos el posible significado de los cambios encontrados, asumiendo que dichos cambios se reflejan en el nivel de proteína.

Existen 7 superfamilias de receptores de membrana, entre ellas la superfamilia de receptores de citocinas tipo I y II que están asociados directamente a la vía JAK/STAT (Favonio *et al.*, 2021). Estos receptores tienen en común la presencia de dominios intracelulares ricos en tirosina y la asociación de cinasas de la familia JAK, una característica particular de esta superfamilia de receptores es que carecen de actividad tirosina quinasa intrínseca. De forma resumida, la unión de sus ligandos, entre ellos hormonas, factores de crecimiento e interleucinas, produce la dimerización de los receptores. La dimerización permite el acople y la fosforilación cruzada entre las JAK, y posteriormente la fosforilación de residuos específicos de tirosina en la cadena intracelular del receptor. De esta forma se activa e inicia la cascada de señalización (Revisado por Favoino *et al.*, 2021).

La familia de cinasas JAK tiene 4 miembros; JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. Las JAK cuentan con 7 dominios, el primero conocido como JH1, el cual se encuentra próximo al extremo carboxilo terminal (-COOH). Contiene un dominio quinasa, capaz de inducir la fosforilación entre miembros de la familia JAK asociadas al receptor, mecanismo conocido como fosforilación cruzada, y de igual forma, la fosforilación de porciones intracelulares de los receptores de membrana, conocido

como transfosforilación, así como las STAT. Después tenemos el dominio pseudo cinasa, conocido como JH2, es capaz de regular a la baja la actividad cinasa del dominio JH1. Dependiendo de su conformación tridimensional puede hacerlo en mayor o menor medida. En este orden, los dominios JH3 y JH4 en conjunto presentan una alta afinidad de unión para residuos fosforilados y la literatura se refiere a ellos como el SH2, debido a la homología con el dominio presente en las STAT. Finalmente, en la porción proximal al amino terminal (-NH<sub>2</sub>), los dominios JH5, JH6 Y JH7 están involucrados en la estabilización de la unión de las JAK con la porción intracelular de los receptores de la superfamilia tipo I y II (Darnell *et al.* 1994; Schindler y Plumlee, 2008; Favoino *et al.*, 2021).

En la vía de señalización, una vez que una JAK se acopla al receptor ocurre la fosforilación cruzada y la transfosforilación. A su vez, los residuos de tirosina fosforilada conforman un sitio de acoplamiento para el siguiente componente de la vía, las proteínas STAT, las cuales son fosforiladas por las JAK.

La familia de las STAT consta de 7 miembros: STAT1-4, STAT5A, STAT5B y STAT6. Su estructura se compone de un dominio de transactivación situado muy cerca del extremo -COOH, el cual es susceptible a fosforilación, un dominio SH2, el cual presenta una alta afinidad de unión por residuos fosforilados, un dominio responsable de unión a ADN y por consecuencia de activación de la transcripción, un dominio *coiled coil* que se sabe que puede regular la expresión génica y finalmente el dominio -NH<sub>2</sub> (Favoino *et al.*, 2021).

Cuando las STAT son fosforiladas por las JAK, se activan, se dimerizan y migran al núcleo donde a través de su dominio de unión a ADN se unen a los promotores de genes diana regulando así su transcripción, con lo que finaliza la vía de señalización JAK-STAT.

Aunque la vía canónica JAK/STAT parece simple y directa, la transducción de señales inducida por citocinas es regulada de manera estricta. A la fecha se conocen 3 clases de inhibidores, las proteínas tirosina-fosfatasa (PTP) las cuales actúan a nivel de núcleo, proteínas inhibidoras de STAT activa (PIAS), y las proteínas supresoras de señalización de citocinas (SOCS). Cabe mencionar que los SOCS comparten la presencia del dominio SH2 con las STATs, lo que le permite interactuar con los receptores activados por la autofosforilación de residuos de tirosina (Revisado por Li, 2008).

Existe otro tipo de proteínas reguladoras en esta vía, como por ejemplo STAM o molécula adaptadora de transducción de señales, que media la señalización río abajo de los receptores de citocinas, además, juega un papel en el tráfico del retículo endoplásmico a Golgi y también formar complejos de clasificación

endosomal, que clasifica las proteínas de membrana marcadas con ubiquitina para la degradación lisosomal (Zanin *et al.*, 2019). Adicionalmente, los componentes de la vía regulan o pueden ser regulados por miembros de otras vías de señalización. Por ejemplo, las vías de ERK/MAP kinase y PI 3-kinase (PI3K), entre otras (Dawson *et al.*, 2009).

## **Tyk2**

La tirosina cinasa 2 (Tyk2) fue el primer miembro de la familia de las JAK en clonarse (Firmbach-Kraft *et al.*, 1990; Krolewski *et al.*, 1990), este gen se expresa en todos los tejidos. Los primeros estudios exhaustivos de la biología de esta cinasa se basaron en ratones genéticamente modificados para expresar una pérdida de función (Karaghiosoff *et al.*, 2000) o en la ablación tisular específica de esta tirosina cinasa (Vielnascher *et al.*, 2014), a través de estos datos se estableció que Tyk2 es necesario para la respuesta inmune a las infecciones, al cáncer y para el desarrollo de la inflamación.

TYK2 está asociado con las cadenas intracelulares de los receptores para interferón alfa (IFNAR1), el receptor para interleucina 12 (IL-12R beta 1), el receptor para interleucina 10 (IL-10R2), el receptor alfa de interleucina 6 (IL6Ra), la subunidad gp130 y el receptor para interleucina 13 (IL-13R alfa 1), los cuales son blanco de una gran variedad de citocinas. Un dato interesante es que las citocinas IL-6 e IL-11 utilizan la subunidad gp130 de los receptores tipo I, así como IL6Ra, a través de los cuales se pueden iniciar los cambios conformacionales que dan paso a la activación de TYK2. Además, TYK2 puede realizar la transfosforilación en combinación con JAK1 Y JAK2, pero no así con JAK3 (Revisado por Strobl *et al.*, 2011). También se sabe que la actividad de la TYK2 está regulada negativamente por mecanismos intrínsecos, como modificaciones postraduccionales, la inhibición conformacional y por factores extrínsecos, como las PTP, e inhibidores como SOCS1 y 3 pero no por SOCS2 (Revisado por Karjalainen *et al.*, 2020).

## **Papel de TYK2 en sistema nervioso**

Aunque la función de TYK2 está mejor estudiada en células del sistema inmune, algunos estudios indican que puede tener un papel relevante en el sistema nervioso. Específicamente, el aumento de la expresión de Tyk2 podría ser relevante en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (EA), la cual se caracteriza por la deposición extracelular del péptido amiloide (A $\beta$ ), que se genera a partir de la escisión de la proteína precursora amiloide (APP). La acumulación de este péptido se asocia con deterioro cognitivo, demencia y pérdida de memoria, producción de factores proinflamatorios, la activación de la microglía y

subsecuentemente la neurotoxicidad mediada por la producción de especies reactivas de oxígeno y la incapacidad de reciclar los péptidos amiloides acumulados (Querfurth *et al.*, 2010; Cai *et al.*, 2014). Cabe resaltar que los datos encontrados con respecto al papel de TYK2 son contradictorios en el contexto del sistema nervioso, como veremos en este apartado.

Por ejemplo, Wan *et al.*, (2010) estudiaron la respuesta de la vía JAK-STAT a la acumulación del péptido A $\beta$  en ratones transgénicos dobles que expresan una proteína precursora amiloide quimérica de ratón y humano, así como la presenilina 1 humana (APP/PS1). Detectaron un aumento de la fosforilación de STAT3 en la tirosina 705 (Tyr 705), residuo clave en la activación transcripcional de este factor, la fosforilación de STAT3 fue detectada principalmente en corteza e hipocampo. Además, el tratamiento de cultivos neuronales de rata con el fragmento A $\beta$ 42, así como la inyección intra hipocampal con este fragmento, indujo la fosforilación de STAT3. En concordancia con lo anterior, al inducir la reducción de la expresión o la activación de STAT3 se produjo una reducción significativa de la apoptosis generada por A $\beta$ 42. En este mismo trabajo se identificó a TYK2 como un regulador río arriba de STAT3 ya que, en neuronas *knockout* (Tyk2 *-/-*), tanto la activación de STAT3 en respuesta a A $\beta$ , como la muerte neuronal mediada por caspasa 3, resultaron inhibidas.

Más recientemente, Wei *et al.*, (2022) emplearon un modelo de Alzheimer *in vitro*, incubando células microgliales de la línea HMC3 con oligómeros A $\beta$ 42 para activar la microglía, y usaron el medio de cultivo (medio condicionado) para estudiar su efecto en células del neuroblastoma SH-SY5Y. Así encontraron que la IL-6 era uno de los componentes claves del medio condicionado. La exposición de células de neuroblastoma a IL-6 produjo el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS), aumento de la expresión de caspasa 3 y una reducción en el crecimiento de neuritas. El tratamiento con IL-6 condujo además al aumento de la fosforilación de TYK2 y STAT1, lo que sugiere que a mayor fosforilación de TYK2 el efecto neurotóxico de IL-6 se acentúa. Cabe señalar que la producción de IL-6 por parte de microglía activada puede explicar el aumento en la fosforilación de TYK2 y STAT1, así como el aumento en la fosforilación de STAT3 observado por Wan *et al.*, (2010) en los ratones APP/PS1.

### **Papel de TYK2 en el cáncer**

Otra enfermedad donde TYK2 parece desempeñar un rol relevante es en el contexto del cáncer, incluyendo tumores en el sistema nervioso, como ocurre en los tumores malignos de la vaina del nervio periférico (*MPNST*, por sus siglas en inglés). Los MPNST son sarcomas agresivos que surgen más comúnmente si se sufre de la neurofibromatosis tipo 1, un síndrome asociado a alta predisposición al



cáncer. Ocurren con alta frecuencia en individuos que presentan una mutación en el gen *neurofibrosis type 1* (NF1), la cual afecta a 1 de cada 2500 individuos a nivel mundial (Hirbe *et al.*, 2017). En un intento por establecer el papel de esta cinasa en la patogénesis de esta enfermedad, Qin *et al.*, (2019) estudiaron la expresión de TYK2 en tumores malignos de la vaina del nervio periférico. Para ello emplearon ARN de horquilla corta (*shRNA*) y la herramienta de edición genética CRISPR/Cas9 para obtener células murinas *knockdown* y células humanas *knockout* (Tyk2 *-/-*), respectivamente. Demostraron que el silenciamiento y la eliminación de Tyk2 en células que expresaban MPNST aumentó significativamente la muerte celular *in vitro*. Estos efectos fueron acompañados por una disminución en los niveles de Bcl-2 así como un aumento en los niveles de Caspasa-3.

Sin embargo, así como los hallazgos en la EA son controversiales, el papel de TYK2 en el cáncer también lo es. Entre las evidencias más robustas, destaca la aportación de Ide *et al.*, (2008) quienes estudiaron el crecimiento e invasividad del cáncer de próstata apoyándose de líneas celulares, tales como LNCaP, PC-3 y DU145.

Analizaron la expresión en tiempo real de los 4 miembros de las JAK en las 3 líneas celulares, confirmando su presencia en todas, también se analizó por inmunohistoquímica la expresión de Tyk2 en muestras de tejido prostático humano, hallando una reactividad significativamente alta en tejido canceroso comparado con tejido sano y ubicando la distribución de TYK2 de forma predominante en citoplasma. Para elucidar la importancia de este hallazgo, evaluaron el papel de TYK2 en la proliferación y en la invisibilidad inducida por el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA). Usando un inhibidor de tirosina cinasa (Tirfostina A1), que interfiere con la cascada de señalización y un ARN silenciador para Tyk2, encontraron que ni el silenciamiento ni la inhibición de Tyk2 modifican la proliferación de la línea DU145. Sin embargo, ambas maniobras reducen la migración de las células en ensayos de matrigel. El tratamiento con Tirfostina A1 inhibió la invasividad de la línea DU145 en presencia y ausencia de uPA, adicionalmente las células transfectadas con el *siRNA* para Tyk2 mostraron una reducción de la invasividad en comparación con células transfectadas con un ARN silenciador control. Estos datos en conjunto sugieren que el silenciamiento de Tyk2 no reduce la tasa de proliferación, pero si atenúa el efecto invasivo mediado por uPA en modelos *in vitro* de cáncer prostático (Ide *et al.*, 2008).

Otra evidencia sobre la importancia de TYK2 para frenar la metástasis es la proporcionada por Zhang *et al.*, (2011) en un modelo de cáncer de mama. Usando ratones *knockout* (Tyk2 *-/-*), examinaron la influencia de esta cinasa en proliferación y capacidad metastásica de la línea celular de cáncer de mama 4T1.

Inocularon células 4T1 en glándulas mamarias de ratones hembra Tyk2  $-/-$ . Dado que las células 4T1 cuentan con resistencia a la 6-tioguanina, una molécula empleada en el tratamiento de leucemia aguda, y también cuentan con la capacidad de hacer metástasis en pulmón e hígado, por ello, se contabilizaron las colonias metastásicas en estos 2 tejidos, y este grupo de investigadores encontraron, un aumento significativo de colonias metastásicas en ratones Tyk2  $-/-$ , en comparación con ratones Tyk2  $+/+$ . En otras palabras, la expresión de Tyk2 parece frenar la aparición de colonias metastásicas. También hallaron un aumento en el volumen del tumor de 2 veces en ratones Tyk2  $-/-$  comparados con ratones Tyk2  $+/+$ , en cuanto a la masa del tumor se observó un aumento de 3.5 veces, la masa del bazo aumentó 4 veces.

Más aún, hay una serie de componentes clave para la vigilancia inmunológica, como lo son las células NK, CD4<sup>+</sup>, células T CD8<sup>+</sup>, así como la producción de interferón gamma, en este sentido, Zhang *et al.*, (2011) encontraron que en ratones Tyk2  $-/-$  había una concentración 2.5 veces menor de interferón gamma en sobrenadante de tumores primarios en comparación con tumores aislados de ratones Tyk2  $+/+$ . Sin embargo determinaron que el crecimiento acelerado de las células 4T1 en ratones Tyk2  $-/-$  no parece estar relacionado con el decremento de la función de alguno de los componentes de la vigilancia inmunológica, pero el efecto supresor tumoral de Tyk2 si parece estar mediado, al menos en parte, por células supresoras derivadas mieloides, compuestas principalmente por macrófagos inmaduros, granulocitos inmaduros y células dendríticas inmaduras, las cuales suprimen la función de las células T y en consecuencia, la respuesta inmune al cáncer.

Por otro lado, como se mencionó en las generalidades para TYK2, esta cinasa se encuentra asociada a las cadenas intracelulares de distintos receptores entre ellos los de interferón alfa, beta y gama. Se sabe, por ejemplo, que el interferón gama ejerce su acción en la vía JAK/STAT a través de la activación de JAK1 y JAK2, que a su vez activan a STAT1; mientras que los interferones alfa y beta ejercen activando a JAK1 y TYK2, dando paso a su vez, río abajo, a la activación de STAT1 y 2. Además, la interrupción de la expresión de receptores de interferón gamma y alfa, así como de Stat1 en ratones, resulta en la inhibición de la respuesta antitumoral, así como de la inmuno vigilancia contundente del cáncer (Zhang *et al.*, 2011).

De acuerdo con los autores no hay evidencia de que las mutaciones que suprimen la actividad quinasa de TYK2 puedan predisponer a la formación de tumores. Sin embargo, además de las mutaciones, pueden ocurrir cambios en la proteína TYK2 que afectan parcialmente la capacidad de IL-12 para inducir la producción de interferón gamma por parte de células T, que como ya se mencionó, juegan un

papel fundamental en la promoción de respuestas antitumorales (Zhang *et al.*, 2011).

## **Socs2**

La familia SOCS (*Suppressors of Cytokine Signaling*) (SOCS1-3 y CIS) forman parte de un sistema clásico de retroalimentación negativa que regula la transducción de señales de citocinas. Se sabe que la familia de SOCS, a menudo se expresan en células a niveles casi indetectables o muy bajos, pero rápidamente son inducidos en presencia de citocinas, entre ellas IL-2, IL-3, IL-6, IFN- $\gamma$ , prolactina y la hormona del crecimiento (GH) (Starr *et al.*, 1997; Naka *et al.*, 1997; Cohny *et al.*, 1999; Pezet *et al.*, 1999, Davey *et al.*, 1999).

La familia SOCS cuenta con un motivo ubicado en el extremo carboxilo terminal denominado *SOCS box motif* o caja SOCS, a diferencia de SOCS1 y 3, SOCS2 no puede unirse a ningún miembro de la familia JAK o inhibir su actividad de forma directa, sin embargo, SOCS2 es capaz de formar un complejo de ubiquitina ligasa E3 a través de la asociación con proteínas adaptadoras llamadas Elonginas (B y C), que además estabilizan el dominio SH2 y con ello la asociación con receptores con residuos de tirosina fosforilados (activados). Otras proteínas que forman parte del complejo son *Cullin 5* y *Rbx2*, cuyo reclutamiento permite al complejo la ubiquitinación y degradación proteasomal de las proteínas unidas a los dominios SH2 (Zhang *et al.*, 1999, Kamura *et al.*, 2004, Vesterlund *et al.*, 2011, Bulatov *et al.*, 2015)

## **Retroalimentación negativa de la vía de señalización de GH**

Un escenario donde el incremento de SOCS2 es importante, es en la vía de señalización de la hormona del crecimiento (GH). La cual comienza con la unión de GH a su receptor (GHR), el GHR se dimeriza dando paso a la autofosforilación de las cinasas, en este caso JAK2. Después STAT5 es fosforilado por JAK2, se dimeriza y migra al núcleo donde induce la expresión de genes sensibles a GH. Uno de estos genes es *Socs2*, el cual, una vez traducido ejerce un efecto regulador negativo de la señalización de GHR promoviendo el marcaje del receptor con ubiquitina y permitiendo su internalización para así ser degradado (Greenhalgh *et al.*, 2002). La relevancia de este mecanismo de retroalimentación se ha puesto de manifiesto mediante una mutación puntual (R96C) en el dominio funcional SH2 de SOCS2, que anula la afinidad de este sitio por el fosfopéptido de GHR en ovejas y eso resulta en el aumento de talla y peso en un 24% y 18% respectivamente (Rupp *et al.*, 2015). Otro ejemplo son los ratones knockout (*Socs2* *-/-*) que exhiben gigantismo (Metcalf *et al.*, 2000). Así mismo, otros estudios indican que el aumento de la expresión de *Socs2* está ligado a un proceso regulatorio tanto de patologías como la enfermedad de Huntington, así

como de la proliferación y neurogénesis, como se explica en las siguientes secciones.

### **Papel en la enfermedad de Huntington**

Se ha sugerido que SOCS2 puede desempeñar un papel importante en la salud y la enfermedad, ejemplo de esto último son las enfermedades neurodegenerativas.

Las evidencias al respecto provienen de los estudios de Cho *et al.*, (2021) en ratones modelo de la enfermedad de Huntington (EH), así como una línea celular de estriado de esta misma especie que expresa el exón 1 del alelo humano para la huntingtina (STHdh Q111). La EH se caracteriza por la extensión aberrante del trinucleótido (CAG) que desencadena agregados patológicos de poliglutamina (PoliQ), lo cual se traduce en un marcado declive de funciones cognitivas y motoras. Cho *et al.*, (2021) encontraron un aumento a nivel de mensajero de Socs2 en el cerebro de ratones con EH, también se observó un aumento de la secreción de SOCS2 en suero de estos ratones en comparación con ratones salvajes, conocidos como *Wild type* (WT).

Asimismo, en la línea celular STHdh Q111 encontraron un aumento de SOCS2 a nivel de proteína comparado con la línea celular control (STHdh Q7). De manera interesante, la expresión de Socs2 aumentó aún más al exponer las células a hidroxiaurea, lo que simula condiciones de envejecimiento. Al inhibir la expresión de Socs2 en la línea celular, con ARN de interferencia (*siRNA*) se generó disfunción autofágica en la línea celular estriatal, debido a que induce el aumento en la expresión de p62, LC3-II y LAMP2A, proteínas clave en la autofagia, lo que permite el correcto reciclamiento de los fragmentos de poliglutamina y el rescate de la célula de un posible daño al ADN.

### **Papel en la neurogénesis hipocampal adulta**

Un escenario donde se ha adjudicado a SOCS2 un papel fundamental es en la neurogénesis hipocampal adulta (*AHN*, por sus siglas en inglés), que ocurre principalmente en la Zona Subgranular (ZSG) del Giro Dentado. (Ransome y Turnley, 2008).

Ransome y Turnley, (2008), estudiaron las alteraciones en la señalización de la GH, empleando ratones knockout para el receptor de la hormona del crecimiento (*Ghr -/-*), ratones transgénicos que sobre expresan Socs2 (*Socs2-Tg*) y ratones *wild-type* (WT) con los que evaluaron la *AHN* antes y después de someter a los ratones a un esquema de ejercicio. Para evaluar la neurogénesis se usó bromodesoxiuridina (BrdU). La proliferación neuronal se midió 7 días después de la inducción de ejercicio, y se monitoreó la persistencia del marcaje con BrdU hasta los 28 días. De esta forma se encontró que el ejercicio indujo un incremento

en el conteo de células marcadas con BrDU dentro de la ZSG en los tres grupos, WT, Ghr<sup>-/-</sup> y Socs2-Tg. Con respecto a la persistencia del marcaje con BrdU, se encontró que los animales Socs2-Tg presentaban una mayor densidad de células marcadas en la capa granular, comparado con los grupos Ghr<sup>-/-</sup> y WT.

En concordancia con lo observado por Ransome y Turnley (2008), Choi *et al.*, (2009) usando un modelo de isquemia transitoria en el prosencéfalo de rata, encontraron, mediante hibridación *in situ*, una sobreexpresión de Socs2 en astrocitos reactivos en hipocampo 3 días después de la reperusión. La sobreexpresión ocurrió particularmente en la región CA1 y regiones hiliares del giro dentado, y este patrón de expresión se sostuvo durante más de 2 semanas. De igual forma, se detectó el aumento transitorio de la expresión de Socs2 en la ZSG, la cual ocurre entre los días 3 y 7. Además, las muestras fueron sometidas a una doble incubación con anticuerpos monoclonales contra la proteína ácida fibrilar glial (SOCS2/GFAP), contra el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y contra nestina. De esta forma, se detectó la coexpresión de SOCS2 con estos marcadores neuronales propios del sistema nervioso en desarrollo, por lo que concluyeron que SOCS2 participa activamente en la *AHN* (Choi *et al.*, 2009).

### **Papel en el cáncer**

Otro escenario donde el SOCS2 juega un papel muy relevante es en el contexto del cáncer, ya que, es un regulador clave en la vía de señalización de la GH. Cabe mencionar también, que SOCS2 también es parte de las vías de señalización del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (*IGF-1*) y la prolactina, las cuales han sido implicadas en la carcinogénesis (Hoefler *et al.*, 2014). Como mencionamos en la introducción, los canales de sodio también se expresan en células cancerosas (Revisado por Brackenbury, 2012).

Entre las evidencias más robustas sobre el papel de SOCS2 en el desarrollo de cáncer están los trabajos de, Hoefler *et al.*, (2014), quienes realizaron una amplia labor para dilucidar el papel de SOCS2 en el cáncer de próstata. Primero, evaluaron cambios en niveles de expresión con la técnica de microarreglo de tejidos (*Tissue Microarray* o *TMA*) y encontraron que SOCS2 a nivel de proteína se encuentra regulado al alza en muestras tumorales de pacientes con cáncer de próstata. Además, evaluaron la expresión de SOCS2 en condiciones de metástasis en muestras de hueso y nódulo linfático, encontrando una sobreexpresión de SOCS2 en comparación con tejido sano. En tejido tumoral primario de cáncer prostático, la sobreexpresión de SOCS2 se correlacionó con una reducción en la supervivencia libre de recaídas.

Para evaluar la influencia de SOCS2 en el crecimiento celular, se llevaron a cabo ensayos de silenciamiento, para ello transfectaron las líneas celulares PC3,

DU145 y LNCaP con un *shRNA*, el cual abolió la actividad de Socs2, esto condujo a una reducción de la proliferación tumoral, Por otro lado, la sobreexpresión de Socs2 incrementó la proliferación en la línea PC3. Adicionalmente, el silenciamiento de Socs2 resultó en un ligero aumento en la tasa de apoptosis en las líneas PC3 y DU145, pero de manera sorpresiva, en la línea LNCaP esta tasa fue del 40%.

El análisis estadístico reveló una detención de las líneas PC3 y DU145 en la fase S del ciclo celular. Además de un aumento en el porcentaje de células en fase G2/M en la línea PC3. Adicionalmente la proporción de células en fase G0/G1 se redujo significativamente en ambas líneas después del silenciamiento de Socs2.

En general, este estudio sugiere que la expresión de SOCS2 en cáncer prostático tiene un papel pro-metastásico, pro-proliferativo y anti apoptótico *in vivo* e *in vitro* (Hoefler *et al.*, 2014).

Otro estudio interesante es el de Hackl *et al.*, (2015), en Leucemia Mieloide Aguda (LMA), la cual es caracterizada por la proliferación excesiva de blastocitos parcialmente diferenciados o indiferenciados, que reemplazan la producción de células sanguíneas normales. En este estudio, se analizó la expresión génica de 11 pacientes con un cariotipo normal en el momento del diagnóstico, posteriormente se descubrió que en pacientes con recaída 536 genes estaban significativamente sobre expresados, incluyendo a Socs2.

En la LMA, el papel crucial de la señalización de JAK STAT está bien documentado, en este sentido la inducción de la expresión de Socs2 de forma experimental promovió la proliferación de las líneas celulares malignas mieloides humanas U-937 y HL-60 (Revisado por Grandits y Weiser, 2021). En consistencia con esta observación, la expresión de Socs2 aumentó significativamente en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC) en fase de crisis blástica, en comparación con pacientes en fase crónica y controles sanos.

Sin embargo, los datos de regulación a la alza o a la baja de Socs2 difieren, al parecer, dependiendo del tejido y el tipo de cáncer, pues también existen evidencias acerca de que la sobreexpresión no necesariamente impulsa la proliferación o malignidad, como ejemplo tenemos el trabajo de Haffner *et al.*, (2007) quienes determinaron los niveles de expresión de la familia Socs (1-3 y CIS) en cáncer de mama, encontrando que tumores con una alta expresión del mensajero se relacionaban con grados bajos de malignidad, a nivel de proteína observaron que una alta expresión también se relacionaba con un bajo índice de proliferación celular, de igual forma la alta expresión de SOCS2 se correlaciono con un supervivencia prolongada.

Otro ejemplo, son los datos aportados por Liu, *et al.*, (2021) quienes realizaron experimentos funcionales *in vitro* en línea celular de carcinoma hepatocelular (CHC), cómo resultado obtuvo que la sobreexpresión de SOCS2 inhibe la proliferación y migración de células de CHC.

### **Stam 1**

STAM1 o molécula adaptadora de transducción de señales, inicialmente fue identificada como una fosfotirosina estimulada por una variedad de citocinas y factores de crecimiento. Se sabe que se asocia con la tirosina quinasa JAK2 y JAK3, también participa en la regulación *in vitro* de la transducción de señales intracelulares mediada por interleucina 2 y por el factor estimulante de colonias granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Takeshita *et al.*, 1996).

Se compone de una estructura única que contiene un dominio de homología Src 3 (SH3) y otro nombrado ITAM o motivo de activación basado en inmuno receptor de tirosina. Takeshita *et al.*, (1996) fueron los primeros en clonar Stam, este grupo de investigadores documentó la expresión de ARNm de Stam en varias líneas celulares humanas incluyendo líneas hematopoyéticas linfoides y no linfoides, también se detectó un transcrito de Stam en tejidos de ratón, incluidos cerebro, timo, corazón, pulmón, hígado, bazo, riñón y testículos, estos resultados sugieren que Stam se expresa de forma ubicua entre una variedad de tipos de células y tejidos.

A nivel de proteína, STAM1 se ha visto involucrada en la regulación a la baja del receptor tirosina quinasa a través del cuerpo multivesicular (MVB), esto se lleva a cabo debido a que forma parte del complejo ESCRT-0, uno de los 4 complejos involucrados en la clasificación de proteínas, que participan en múltiples procesos celulares, incluyendo el reciclamiento o proteólisis mediada por ubiquitinación y el crecimiento de neuritas, entre otros. Conocidos como *endosomal sorting complexes required for transport*, en conjunto con el sustrato de tirosina quinasa regulado por el factor de crecimiento hepatocitario (Hgs/Hrs) (Nam y Lee, 2016).

### **Evidencias de Stam1 en sistema nervioso**

Aunque STAM fue originalmente estudiada en el contexto de la respuesta inflamatoria, las evidencias de su papel en la supervivencia neuronal se han ido acumulando.

Por ejemplo, se sabe que los ratones *knockout* (Stam1 *-/-*) poseen una respuesta inmune a citocinas bien conservada, pero presentan pérdida de neuronas piramidales hipocampales en el área CA3, las cuales parecen ser más sensibles a la excitotoxicidad (Yamada *et al.*, 2001).

Nam y Lee, (2016) aportaron evidencias acerca de que el complejo ILS 1-LHX3, específico de motoneuronas, transactiva el gen para Stam1, y que, a nivel de proteína, STAM1 juega un papel importante en la proyección axonal de las motoneuronas, debido a que en conjunto con la subunidad HRS forman un complejo de clasificación endosomal de proteínas de carga, que tiene como objetivo entre otras proteínas, al receptor de quimiocinas CXCR4. Como resultado la ausencia de la señalización del receptor CXCR4 provoca la proyección dorsal en lugar de una proyección ventral de los axones de las motoneuronas. Además, la abolición de la actividad de STAM1 en la médula espinal del polluelo en desarrollo provoca la regulación a la baja del receptor CXCR4, en consecuencia, se lleva a cabo la proyección dorsal de los axones de las motoneuronas. Más aún, la sobreexpresión de STAM1 Y CXCR4 también provoca la proyección dorsal aberrante de los moto-axones, lo que sugiere que el complejo de transactivación ILS 1-LHX3, así como la regulación de los niveles de proteína de STAM1 y CXCR4 juegan un papel crucial en este proceso durante el desarrollo embrionario.

### **Evidencias de expresión de Stam1 en estudios en cáncer**

Un trabajo que nos llama la atención es el realizado por Campos-Parra *et al.*, (2016), su objetivo fue encontrar posibles blanco terapéuticos para pacientes con cáncer cervical local avanzado (*Locally Advanced Cervical Cancer*), realizaron un perfil de transcriptoma basado en tecnología de microarreglos de 89 muestras de tumores de mujeres con este tipo de cáncer, los resultados se analizaron empleando la *KEGG*, identificando genes sobreexpresados de manera significativa, los cuales fueron validados a través de PCR en tiempo real, el análisis de transcriptoma tuvo como resultado 7530 genes sobreexpresados, producto del análisis en la *KEGG* encontraron 93 vías de señalización enriquecidas entre ellas, la vía JAK-STAT, NOTCH, y mTOR, entre los ARNm sobre expresados se encontró Stam1, y esta expresión se confirmó mediante PCR tiempo real, este dato es consistente con nuestros resultados obtenidos en experimentos de PCR en respuesta a la expresión heteróloga del Na<sub>v</sub>1.2CT en la línea NIE-115, sin embargo es necesario profundizar la investigación en aspectos funcionales, pues este trabajo se limitan a reconocer cambios en el patrón de expresión.

Más recientemente Deng *et al.*, 2021, emplearon líneas celulares de cáncer de riñón (786-O y A498) que fueron transfectadas con Stam1, encontraron que la sobreexpresión de Stam1 inhibe la viabilidad, invasividad y migración celular. Previo a los experimentos en línea celular, realizaron el análisis de perfiles de expresión de muestras de cáncer de riñón, encontrando una expresión a la baja de Stam1, cabe resaltar que en cuestiones metodológicas este grupo de investigadores empleó herramientas usadas también por nosotros en este trabajo,



por ejemplo, la *Database for Annotation Visualization and Integrated Discovery* (<https://david.ncifcrf.gov/>) que facilita la interpretación de listas de genes regulados en experimentos de microarreglos, empleando herramientas como las anotaciones funcionales proporcionadas por GO (*Gene Ontology*) y la *KEGG*. Este grupo de investigadores consideró aquellas vías enriquecidas, con al menos 2 genes y con un valor  $P < 0.05$ , de igual forma que lo hicimos nosotros.

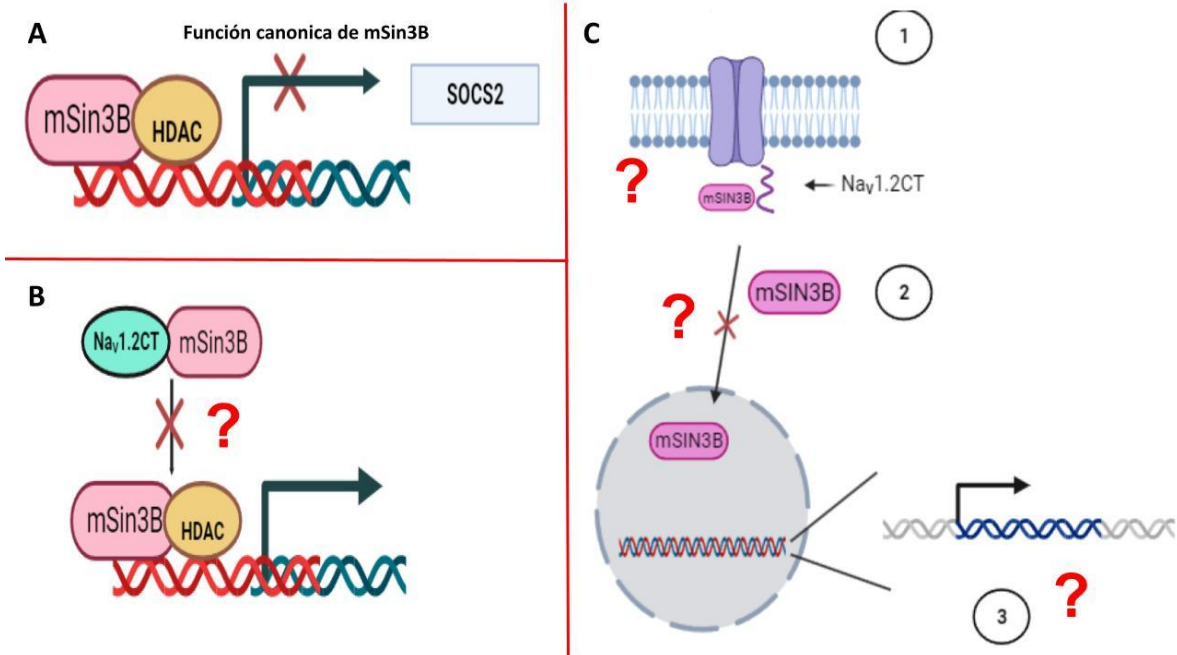
## **CONCLUSIÓN**

Experimentos previos del laboratorio aportaron evidencias acerca de la interacción del carboxilo terminal de  $\text{Na}_v1.2$  a nivel de membrana con mSin3B y otras proteínas relacionadas con la transcripción, y nuestros resultados mostraron que la expresión heteróloga del fragmento  $\text{Na}_v1.2\text{CT}$  produjo cambios a nivel transcripcional en la línea celular N1E-115, en los genes *Stam1*, *Socs2* y *Tyk2*, los cuales son miembros de la vía de señalización JAK-STAT y blancos de mSin3B, lo que sugiere que la interacción  $\text{Na}_v1.2\text{CT}/\text{mSin3B}$  puede afectar la expresión de los mismos. Para dilucidar el mecanismo exacto de cómo estos cambios se han observado, planteamos las siguientes perspectivas.

## **PERSPECTIVAS**

- Investigar el mecanismo por el cual se podría liberar el fragmento  $\text{Na}_v1.2\text{CT}$ .
- Analizar en qué condiciones, fisiológicas o fisiopatológicas, se podría liberar el fragmento  $\text{Na}_v1.2\text{CT}$ .
- Determinar si la interacción a nivel de membrana entre el  $\text{Na}_v1.2\text{CT}$  con el mSin3B provoca una retención de esta proteína de andamiaje y si hay un cambio en la concentración de mSin3B en el citosol y en el núcleo.
- Si lo anterior es cierto, investigar si el cambio en la concentración de mSin3B a nivel de citosol o núcleo provoca cambios en la transcripción de sus genes blanco.
- Determinar si la interacción entre  $\text{Na}_v1.2\text{CT}$  y mSin3B promueve o impide la unión de proteínas con dominios de unión al ADN.





**Figura 12.** (A) Función canónica del mSin3B como proteína de andamiaje en la formación de complejos represores de la transcripción, (B) Figura hipotética donde la interacción entre mSin3B y el Na<sub>v</sub>1.2CT impide el reclutamiento de proteínas con dominios de unión al ADN que proveen de funciones transcripcionales, (C) Figura hipotética donde el mSin3B es retenido por el Na<sub>v</sub>1.2CT a nivel de membrana, por ello cambia la concentración a nivel de citosol y núcleo, lo cual repercute en la transcripción.

## REFERENCIAS

1. Beneski, D., Catterall, W. (1980). Covalent labeling of protein components of the sodium channel with a photoactivable derivative of scorpion toxin. *PNAS*, 77, 639–643.
2. Black, J., Newcombe, J., and Waxman, S. (2013). Nav1.5 sodium channels in macrophages in multiple sclerosis lesions. *Mult Scler*, 19, 532–542.
3. Boulikas, T. (1993). Nuclear localization signals (NLS). *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr*, 3(3), 193-227.
4. Bouza, A. A., Isom, L. L. (2017). Voltage-Gated Sodium Channel  $\beta$  Subunits and Their Related Diseases. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 423–450.
5. Brackenbury, W., Chioni, A., Diss, J., Djamgoz, M. (2007). The neonatal splice variant of Nav1.5 potentiates in vitro invasive behavior of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.*, 101(2):149-60.
6. Brackenbury, W. (2012). Voltage-gated sodium channels and metastatic disease. *Channels*, 6(5), 352–361.
7. Bulatov, E., Martin, E., Chatterjee, S., Knebel, A., Shimamura, S., Konijnenberg, A., Ciulli, A. (2015). Biophysical studies on interactions and assembly of full-size E3 ubiquitin ligase: suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2)-elongin BC-cullin 5-ring box protein 2 (RBX2). *J. Biol. Chem*, 290(7), 4178-4191.
8. Cai, Z., Hussain, M., Yan, L. (2014). Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Int. J. Neurosci*, 124(5), 307-321.
9. Campos-Parra, A., Padua-Bracho, A., Pedroza-Torres, A., Figueroa-González, G., Fernández-Retana, J., Millan-Catalan, O., Pérez-Plasencia, C. (2016). Comprehensive transcriptome analysis identifies pathways with therapeutic potential in locally advanced cervical cancer. *Gynecologic oncology*, 143(2), 406-413.

10. Catterall, W. (2013). Structure and function of voltage-gated sodium channels at atomic resolution. *Exp. Physiol*, 99(1), 35–51.
11. Chatelier, A., Mercier, A., Tremblier, B., Theriault, O., Moubarak, M., Benamer, N., Corbi, P., Bois, P., Chahine, M., and Faivre, J.F. (2012). A distinct de novo expression of Nav1.5 sodium channels in human atrial fibroblasts differentiated into myofibroblasts. *J. Physiol*, 590, 4307–4319.
12. Cho, K., Kim, S., Choi, S. (2021). Suppressor of cytokine signaling 2 is induced in Huntington's disease and involved in autophagy. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 559, 21-27.
13. Choi, J., Shin, Y., Lee, J., Choi, J., Cha, J., Chun, M., Lee, M. (2009). Enhanced expression of SOCS-2 in the rat hippocampus after transient forebrain ischemia. *J. Neurotrauma*, 26(11), 2097-2106.
14. Chopra, S., Stroud, D., Watanabe, H., Bennett, J., Burns, C., Wells, K., Roden, D. (2010). Voltage-Gated Sodium Channels Are Required for Heart Development in Zebrafish. *Circulation Research*, 106(8), 1342–1350.
15. Cohnen, J., Sanden, D., Cacalano, A. (1999). SOCS-3 is tyrosinephosphorylated in response to interleukin-2 and suppresses STAT5 phosphorylation and lymphocyte proliferation. *Mol. Cell. Biol*, 19:4980-4988.
16. Darnell, J., Kerr, I., Stark, G. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 264: 1415–1421.
17. Davey, W., McLachlan, J., Wilkins, J. (1999). STAT5b mediates the GH-induced expression of SOCS-2 and SOCS-3 mRNA in the liver. *Mol. Cell. Endocrinol*, 158:111-116.
18. Dawson, M., Bannister, A., Gottgens, B., Foster, S., Bartke, T., Green, A., Kouzarides, T. (2009). JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1a from chromatin. *Nature*, 461: 819–822.
19. Deng, T., He, Z., Duan, X., Gu, D., Cai, C., Wu, W., Zeng, G. (2021). STAM Prolongs Clear Cell Renal Cell Carcinoma Patients' Survival via Inhibiting Cell Growth and Invasion. *Front. Oncol*, 11.

20. Draghici, S., Khatri, P., Eklund, A. C., Szallasi, Z. (2006). Reliability and reproducibility issues in DNA microarray measurements. *Trends in Genetics*, 22(2), 101-109.
21. Eberhardson, M., Grapengiesser, E. (1999). Role of voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels for rhythmic Ca<sup>2+</sup> signalling in glucose-stimulated mouse pancreatic beta-cells. *Cell Signal*, 11, 343–348.
22. Favoino, E., Prete, M., Catacchio, G., Ruscitti, P., Navarini, L., Giacomelli, R., Perosa, F. (2021). Working and safety profiles of JAK/STAT signaling inhibitors. Are these small molecules also smart? *Autoimmunity Reviews*, 20(3), 102750.
23. Firmbach-Kraft, I., Byers, M., Shows, T., Dalla-Favera, R., Krolewski, J. (1990). tyk2, prototype of a novel class of non-receptor tyrosine kinase genes. *Oncogene*, 5(9), 1329-1336.
24. Grandits, A., Wieser, R. (2021). Gene expression changes contribute to stemness and therapy resistance of relapsed acute myeloid leukemia: roles of SOCS2, CALCRL, MTSS1, and KDM6A. *Experimental hematology*, 99, 1-11.
25. Greenhalgh, C., Bertolino, P., Asa, S., Metcalf, D., Corbin, J. (2002). La mejora del crecimiento en ratones deficientes en el supresor de la señalización de citoquinas 2 (SOCS-2) depende del transductor de señal y el activador de la transcripción 5b (STAT5b). *Mol Endocrinol*, 16: 1394–1406.
26. Goldin, A., Snutch, T., Lubbert, H., Dowsett, A., Marshall, J., Auld, V., Downey, W., Fritz, L., Lester, H., Dunn, R., Catterall, W., Davidson, N. (1986). Messenger RNA coding for only the  $\alpha$  subunit of the rat brain Na channel is sufficient for expression of functional channels in *Xenopus* oocytes. *PNAS*, 83, 7503–7507.
27. Gómez-Mayén, A., Guillé, G., Ruiz, L., Coutiño, G. (2006). The GenArise Package. *Instituto de Fisiología Celular UNAM. Mexico DF*, 1-27.



28. Gómez-Ospina, N., Tsuruta, F., Barreto-Chang, O., Hu, L., Dolmetsch, R. (2006). The C Terminus of the L-Type Voltage-Gated Calcium Channel  $Ca_v1.2$  Encodes a Transcription Factor. *Cell*, 127(3), 591–606.
29. Ghoreschi, K., Laurence, A., O’Shea, J. (2009). Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol Rev*, 228: 273–287.
30. Hackl, H., Steinleitner, K., Lind, K., Hofer, S., Tosic, N., Pavlovic, S., Wieser, R. (2015). A gene expression profile associated with relapse of cytogenetically normal acute myeloid leukemia is enriched for leukemia stem cell genes. *Leukemia & lymphoma*, 56(4), 1126-1128.
31. Haffner, M., Petridou, B., Peyrat, J., Révillion, F., Müller-Holzner, E., Daxenbichler, G., Doppler, W. (2007). Favorable prognostic value of SOCS2 and IGF-I in breast cancer. *BMC cancer*, 7(1), 1-9.
32. Hartshorne, R., Messner, D., Coppersmith, J., Catterall, W. (1982). The saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain. Evidence for two nonidentical  $\beta$  subunits. *J. Biol. Chem*, 257, 13888–13891.
33. Hartshorne, R., Catterall, W. (1984). The sodium channel from rat brain. Purification and subunit composition. *J. Biol. Chem*, 259, 1667–1675.
34. Hirbe, A., Kaushal, M., Sharma, M., Dahiya, S., Pekmezci, M., Perry, A., Gutmann, D. (2017). Clinical genomic profiling identifies TYK2 mutation and overexpression in patients with neurofibromatosis type 1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors. *Cancer*, 123(7), 1194-1201.
35. Hodgkin, A., Huxley, A. (1952). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. *J. Physiol*, 116, 449–472.
36. Hofer, J., Kern, J., Ofer, P., Eder, I., Schäfer, G., Dietrich, D., Puhr, M. (2014). SOCS2 correlates with malignancy and exerts growth-promoting effects in prostate cancer. *Endocrine-related cancer*, 21(2), 175.
37. Hornstein, B. D., Roman, D., Arévalo-Soliz, L. M., Engevik, M. A., Zechiedrich, L. (2016). Effects of circular DNA length on transfection efficiency by electroporation into HeLa cells. *PloS one*, 11(12), e0167537.

38. House, C., Vaske, C., Schwartz, A. (2010). Voltage-gated Na<sup>+</sup> channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion. *Cancer Res*, 70(17):6957-67.
39. Ide, H., Nakagawa, T., Terado, Y., Kamiyama, Y., Muto, S., Horie, S. (2008). Tyk2 expression and its signaling enhances the invasiveness of prostate cancer cells. *BBRC*, 369(2), 292-296.
40. Isom, L., De Jongh, K., Patton, D., Reber, B., Offord, J., Charbonneau, H., Walsh, K., Goldin, A., Catterall, W. (1992). Primary structure and functional expression of the  $\beta$ 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science*, 256, 839–842.
41. Isom, L., Ragsdale, D., De Jongh, K., Westenbroek, R., Reber, B., Scheuer, T., Catterall, W. (1995). Structure and function of the  $\beta$ 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with CAM-motif. *Cell*, 83, 433–442.
42. Jun-Ichiro, J., Yasuhiko, T. (2008). Non-viral gene transfection technologies for genetic engineering of stem cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm*, 68:90-104.
43. Kadamb, R., Mittal, S., Bansal, N., Batra, H., Saluja, D. (2013). Sin3: insight into its transcription regulatory functions. *European journal of cell biology*, 92(8-9), 237-246.
44. Kamura, T., Maenaka, K., Kotoshiba, S., Matsumoto, M., Kohda, D., Conaway, R., Nakayama, K. (2004). VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. *Genes & development*, 18(24), 3055-3065.
45. Karaghiosoff, M., Neubauer, H., Lassnig, C., Kovarik, P., Schindler, H., Pircher, H., Müller, M. (2000). Partial impairment of cytokine responses in Tyk2-deficient mice. *Immunity*, 13(4), 549-560.
46. Karjalainen, A., Shoebridge, S., Kronic, M., Simonović, N., Tebb, G., Macho-Maschler, S., Müller, M. (2020). TYK2 in tumor immunosurveillance. *Cancers*, 12(1), 150.
47. Kreiss, P., Mailhe, P., Scherman, D., Pitard, B., Cameron, B., Rangara, R., Crouzet, J. (1999). Plasmid DNA size does not affect the physicochemical

properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic acids research*, 27(19), 3792-3798.

48. Krolewski, J., Lee, R., Eddy, R., Shows, T., Dalla-Favera, R. (1990). Identification and chromosomal mapping of new human tyrosine kinase genes. *Oncogene*, 5(3), 277-282.
49. Kruger, L., Isom, L. (2016). Voltage-Gated Na<sup>+</sup>Channels: Not Just for Conduction. Cold Spring Harbor, *Perspectives in Biology*, 8(6).
50. Lesueur, L. L., Mir, L. M., André, F. M. (2016). Overcoming the specific toxicity of large plasmids electrotransfer in primary cells in vitro. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 5.
51. Li, W. (2008). Canonical and non-canonical JAK-STAT signaling. *Trends Cell Biol*, 18: 545–551.
52. Liu, J., Liu, Z., Li, W., Zhang, S. (2021). SOCS2 is a potential prognostic marker that suppresses the viability of hepatocellular carcinoma cells. *Oncology Letters*, 21(5), 1-10.
53. Livak, K., Schmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>ΔΔCT method. *methods*, 25(4), 402-408.
54. Longo, P. A., Kavran, J. M., Kim, M. S., Leahy, D. J. (2013). Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). In *Methods in enzymology* (Vol. 529, pp. 227-240). Academic Press.
55. Martin, M. S., Tang, B., Papale, L. A., Yu, F. H., Catterall, W. A., Escayg, A. (2007). The voltage-gated sodium channel Scn8a is a genetic modifier of severe myoclonic epilepsy of infancy. *Human Molecular Genetics*, 16(23), 2892–2899.
56. Metcalf, D., Greenhalgh, J., Viney, E., Willson, A., Starr, R., Nicola, A., Hilton, D., Alexander, W. (2000). Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signalling-2. *Nature*, 29;405 (6790):1069-73.

57. Mironova, E., Stockand, J. (2010). Activation of a latent nuclear localization signal in the NH<sub>2</sub> terminus of  $\gamma$ -ENaC initiates feedback regulation of channel activity. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*, 298 (5), F1188-F1196.
58. Nam, H., Lee, S. (2016). Identification of STAM1 as a novel effector of ventral projection of spinal motor neurons. *Development*, 143(13), 2334-2343
59. Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M. (1997). Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature*, 387:924-929.
60. Nicholson, E., Randall, A. (2009). Na(v)1.5 sodium channels in a human microglial cell line. *J. Neuroimmunol*, 215, 25–30.
61. Noda, M., Suzuki, H., Numa, S., Stühmer, W. (1989). A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS letters*, 259(1), 213-216.
62. Onwuli, D., Yañez-Bisbe, L., Pinsach-Abuin, M., Tarradas, A., Brugada, R., Greenman, J., Pagans, S., Beltran-Alvarez, P. (2017). Do sodium channel proteolytic fragments regulate sodium channel expression? *Channels*, 11(5), 476–481.
63. Ostell, J. (2002). The NCBI Handbook, 2nd edition, Chapter 15, The Entrez Search and Retrieval System.
64. Qin, W., Godec, A., Zhang, X., Zhu, C., Shao, J., Tao, Y., Hirbe, A. (2019). TYK2 promotes malignant peripheral nerve sheath tumor progression through inhibition of cell death. *Cancer medicine*, 8(11), 5232-5241.
65. Querfurth, H., LaFerla, F. (2010). Alzheimer's disease. *NEJM*, 362(4), 329-344.
66. Pezet, A., Favre, H., Kelly, P. (1999). Inhibition and restoration of prolactin signal transduction by suppressors of cytokine signaling. *J. Biol. Chem*, 274:24497-24502.
67. Planells-Cases, R., Caprini, M., Zhang, J., Rockenstein, E. M., Rivera, R. R., Murre, C., Montal, M. (2000). Neuronal Death and Perinatal Lethality in

- Voltage-Gated Sodium Channel  $\alpha$  II -Deficient Mice. *Biophysical Journal*, 78(6), 2878–2891.
68. Ransome, M., Turnley, A. (2008). Growth hormone signaling and hippocampal neurogenesis: insights from genetic models. *Hippocampus*, 18(10), 1034-1050.
69. Reese, K., Caldwell, J. (1999). Immunocytochemical localization of NaCh6 in cultured spinal cord astrocytes. *Glia*, 26, 92–96.
70. Romero-Macías, E. (2021). Posible interacción entre el canal de Sodio Nav1.2 con el factor de transcripción CtBP1[ tesis para optar por el grado de Maestro en Ciencias (Neurobiología), UNAM]. Disponible en: [https://tesionam.dgb.unam.mx/F/QP8UTY2VS99SG9HGP83YX5LX2UVPT5NF5MSJ5FHBSVI8DR3VVQ-01790?func=full-set-set&set\\_number=613754&set\\_entry=000007&format=999](https://tesionam.dgb.unam.mx/F/QP8UTY2VS99SG9HGP83YX5LX2UVPT5NF5MSJ5FHBSVI8DR3VVQ-01790?func=full-set-set&set_number=613754&set_entry=000007&format=999).
71. Rouillard, A., Gundersen, G., Fernandez, N., Wang, Z., Monteiro, C., McDermott, M, Ma'ayan, A. (2016). The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. Database (Oxford).
72. Rupp, R., Senin, P., Sarry, J., Allain, C., Tasca, C., Ligat, L., Tosser-Klopp, G. (2015). A point mutation in suppressor of cytokine signalling 2 (Socs2) increases the susceptibility to inflammation of the mammary gland while associated with higher body weight and size and higher milk production in a sheep model. *PLoS genetics*, 11(12).
73. Schindler, C., Plumlee, C. (2008). Interferons pen the JAK-STAT pathway. *Semin. Cell Dev. Biol*, 19: 311–318.
74. Starr, R., Willson, T., Viney, E., Murray, L., Rayner, J., Jenkins, B., Hilton, D. (1997). A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*, 387(6636), 917-921.
75. Traub, O., Ishida, T., Ishida, M., Tupper, J., Berk, B. (1999). Shear stress-mediated extracellular signal-regulated kinase activation is regulated

- by sodium in endothelial cells. Potential role for a voltage-dependent sodium channel. *J. Biol. Chem*, 274, 20144–20150.
76. Takeshita, T., Arita, T., Asao, H., Tanaka, N., Higuchi, M., Kuroda, H., Sugamura, K. (1996). Cloning of a novel signal-transducing adaptor molecule containing an SH3 domain and ITAM. *BBRC*, 225(3), 1035-1039.
77. Van Wart, A., Matthews, G. (2006). Expression of sodium channels Nav1.2 and Nav1.6 during postnatal development of the retina. *Neuroscience Letters*, 403(3), 315–317.
78. Vassilev, P., Scheuer, T., Catterall, W. (1988). Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science*, 241: 1658–1661.
79. Vega, A. V., Avila, G., Matthews, G. (2013). Interaction between the transcriptional corepressor Sin3B and voltage-gated sodium channels modulates functional channel expression. *Sci. rep*, 3, 2809.
80. Vega, A. V., Henry, D., Matthews, G. (2019). Potential Nuclear Signaling by a C-terminal Fragment Derived from Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.2. (unpublished).
81. Vesterlund, M., Zadjali, F., Persson, T., Nielsen, M., Kessler, B., Norstedt, G., Flores-Morales, A. (2011). The SOCS2 ubiquitin ligase complex regulates growth hormone receptor levels. *PloS one*, 6(9).
82. Vielnascher, R., Hainzl, E., Leitner, N., Rammerstorfer, M., Popp, D., Witalisz, A., Müller, M. (2014). Conditional ablation of TYK2 in immunity to viral infection and tumor surveillance. *Transgenic research*, 23(3), 519-529.
83. Von Reyn, C., Mott, R., Siman, R., Smith, D., Meaney, D. (2012). Mechanisms of calpain mediated proteolysis of voltage gated sodium channel  $\alpha$ -subunits following in vitro dynamic stretch injury. *Journal of neurochemistry*, 121(5), 793-805.
84. Wan, J., Fu, A., Ip, F., Ng, H., Hugon, J., Page, G. (2010). Tyk2/STAT3 signaling mediates  $\beta$ -amyloid-induced neuronal cell death: implications in Alzheimer's disease. *J. Neurosci*, 30(20), 6873-6881.

85. Wei, P., Lee-Chen, G., Chen, C., Chen, Y., Yen-Shi, L., Chang, K. (2022). Isorhamnetin Attenuated the Release of Interleukin-6 from  $\beta$ -Amyloid-Activated Microglia and Mitigated Interleukin-6-Mediated Neurotoxicity. *Oxid. Med. Cell. Longev*, vol 2022.
86. Yamada, M., Takeshita, T., Miura, S., Murata, K., Kimura, Y., Ishii, N., Nose, M., Sakagami, H., Kondo, H., Tashiro, F., Miyazaki, J., Sasaki, H., Sugamura, K. (2001). Loss of hippocampal CA3 pyramidal neurons in mice lacking STAM1. *Mol. Cell. Biol*, (11):3807-19.
87. Yang, M., Kozminski, D., Wold, L., Modak, R., Calhoun, J., Isom, L., Brackenbury, W. (2012). Therapeutic potential for phenytoin: targeting Na(v)1.5 sodium channels to reduce migration and invasion in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 134, 603–615.
88. Yu, F. H., Mantegazza, M., Westenbroek, R. E., Robbins, C. A., Kalume, F., Burton, K. A., Catterall, W. A. (2006). Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nature Neuroscience*, 9(9), 1142–1149.
89. Zhang, J., Farley, A., Nicholson, S., Willson, T., Zugaro, L., Simpson, R., Baca, M. (1999). The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *PNAS*, 96(5), 2071-2076.
90. Zhang, Q., Sturgill, J., Kmiecik, M., Szczepanek, K., Derecka, M., Koebel, C., Lerner, A. (2011). The role of Tyk2 in regulation of breast cancer growth. *JICR*, 31(9), 671-677.
91. Zanin, N., Blouin, C., de Lesegno, C., Chmiest, D., Johannes, L., Lamaze, C. (2019). STAM Interaction with Hrs Controls JAK/STAT Activation by Interferon- $\alpha$  at the Early Endosome. *bioRxiv*, 509968.