



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Participación de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A* en las propiedades metastásicas de líneas celulares de cáncer cervicouterino

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Tonantzin Guadalupe Anguheven Ledezma

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Juan Carlos Gómora Martínez

Instituto de Fisiología Celular

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Rocío Ángeles García Becerra

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dra. Myrian Velasco Torres

Instituto de Fisiología Celular

Ciudad Universitaria, CD. MX., enero de 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Hiriart Urdanivia Marcia

SECRETARIO: Dr. Zarain Herzberg Angel Alfonso

VOCAL: Dr. Encarnación Guevara Sergio Manuel

VOCAL: Dra. Lizano Soberón Marcela

VOCAL: Dr. Luis Baltazar Enoch

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Departamento de Neuropatología Molecular,

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

ASESOR:

Dr. Juan Carlos Gómora Martínez

SUSTENTANTE:

Biól. Tonantzin Guadalupe Anguheven Ledezma

RECONOCIMIENTOS

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

Al Dr. Juan Carlos Gómora Martínez, por aceptarme en su grupo de investigación y por su valiosa enseñanza durante mis estudios de posgrado. Agradezco su paciencia y dedicación como investigador.

A la Dra. Myrian Velasco Torres y a la Dra. Rocío Ángeles García Becerra, por fungir como miembros de mi Comité Tutor. Agradezco todas sus observaciones y consejos durante la evaluación de cada semestre que me permitieron mejorar en mi trabajo de investigación.

A la Dra. Margarita Jacaranda Rosendo Pineda, por toda su enseñanza al comienzo de este proyecto y el apoyo brindado durante toda la realización del mismo. Agradezco su infinita paciencia y el fungir como mentora y amiga.

Al Dr. Osbaldo López Charcas, por su enseñanza y el apoyo en el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Miguel Ramírez Aragón, por el apoyo técnico brindado en el laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio BL-203, Diana, Iván y Ana Lucía, por brindarme su apoyo y amistad.

Agradezco el apoyo brindado por el Laboratorio Nacional de Canalopatías, donde se realizó la adquisición automatizada de imágenes de los experimentos de migración celular.

Agradezco a la Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular, donde se realizó la adquisición de imágenes de microscopía de epifluorescencia.

Agradezco el apoyo brindado por la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Durante mis estudios de maestría gocé de una beca otorgada por el CONACYT.

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM (IN209820 e IN211123). Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida durante el quinto semestre de mis estudios. Este proyecto también fue apoyado por el CONACYT con el donativo A1-S-19171.

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	9
Epidemiología del cáncer	9
Cáncer cervicouterino (CaCu)	10
Canales iónicos	14
Canales de sodio activados por voltaje	15
Expresión alterada de las subunidades α de los canales Nav	18
ANTECEDENTES	20
HIPÓTESIS	28
OBJETIVO GENERAL	28
OBJETIVOS PARTICULARES	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Cultivo de líneas celulares	29
Conteo celular	31
Estandarización del cultivo de células para la transfección con siRNAs	32
Evaluación de la eficiencia de transfección con siRNAs.....	33
Extracción de RNA total	33
Transcripción inversa del DNA.....	35
PCR en tiempo real (qPCR).....	35
<i>Rangos dinámicos</i>	37
Transfección con siRNAs.....	38
Ensayos de Proliferación	39
Ensayos de Migración.....	40
Ensayos de Invasión celular.....	41
Análisis y presentación de datos.....	43
RESULTADOS	44
Conteo celular	44

Estandarización del cultivo de células para la transfección con siRNAs	44
Evaluación de la eficiencia de la transfección con siRNAs.....	44
Extracción de RNA total	45
PCR en tiempo real (qPCR).....	46
<i>Rangos dinámicos</i>	46
<i>Validación de la función de los siRNAs</i>	48
<i>Silenciamiento de las variantes del exón 18 del gen SCN8A</i>	53
Ensayos de Proliferación	60
Ensayos de Migración.....	63
Ensayos de Invasión.....	67
DISCUSIÓN	72
Ensayos de Proliferación	73
Ensayos de Migración.....	75
Ensayos de Invasión.....	76
CONCLUSIONES	81
PERSPECTIVAS	82
REFERENCIAS	83

RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es el cuarto cáncer más frecuente y la cuarta causa de muerte por cáncer en mujeres mayores de 15 años en todo el mundo. En los últimos 25 años se han reportado diversos tipos de canales iónicos asociados con las características distintivas del cáncer. De manera interesante, los canales de sodio activados por voltaje (canales Nav), responsables de la generación y propagación de potenciales de acción en células excitables, han sido relacionados con los procesos de migración e invasión celular en cáncer de mama, ovario, próstata y CaCu, entre otros. Nuestro grupo de investigación reportó al canal Nav1.6 con un nivel de expresión 40 veces mayor en cultivos primarios de CaCu con respecto al tejido cervical no canceroso. Además, mediante ensayos funcionales se encontró una asociación directa entre la actividad de los canales Nav1.6 y la capacidad invasiva de este carcinoma. El gen *SCN8A* que codifica para la subunidad α del canal Nav1.6 genera tres variantes de procesamiento alternativo en el exón 18: 18A, 18N y Δ 18. Otro grupo de investigación ha reportado que la variante Δ 18 se localiza en vesículas intracelulares en células de macrófagos (derivados de leucemia) y de melanoma mediando la formación de invadopodios. Por lo anterior, el objetivo del presente proyecto fue investigar el papel de cada variante de Nav1.6 en la proliferación, migración e invasión celular de las líneas celulares de CaCu: SiHa, HeLa y C33A, las cuales se diferencian por el tipo de VPH al cual son positivas. Para evaluar el papel de cada variante se utilizaron siRNAs específicos que disminuyen su nivel de expresión. Los resultados mostraron una reducción importante de la proliferación e invasión celular cuando se disminuye selectivamente la expresión de las variantes 18A y Δ 18 en las tres líneas celulares. La proliferación celular se reduce entre el 70 y el 80% al silenciar a 18A y Δ 18 en las tres líneas celulares; la migración celular solo se afectó en las células SiHa y, por su parte; la invasión celular se redujo en un 50% en células SiHa al disminuir la expresión de la variante 18A, esta misma tendencia se observa en C33A, sin embargo, en las células HeLa que son las más invasivas, es la variante Δ 18 la que tiene

un efecto sobre la invasividad. Los datos sugieren un efecto diferencial de las variantes 18A y $\Delta 18$ del canal Nav1.6 en la proliferación, migración e invasión celular del CaCu. Estos hallazgos permiten proponer al canal Nav1.6 y, en particular, a la variante $\Delta 18$ como blanco terapéutico en posibles tratamientos contra el CaCu.

ABSTRACT

Cervical cancer (CeCa) is the fourth most common cancer and the fourth cause of cancer death in women over 15 years old worldwide. In the last 25 years, various types of ion channels have been associated with the hallmarks of cancer. Interestingly, voltage-gated sodium channels (Nav channels), responsible for the generation and propagation of action potentials in excitable cells, have been related to cell migration and invasion processes in breast, ovarian, prostate cancer and CeCa, among others. Our research group reported the Nav1.6 channel with a 40-fold higher expression level in primary CeCa cultures compared to non-cancerous cervical tissue. Furthermore, through functional assays, a direct association was found between the activity of Nav1.6 channels and the invasiveness of this carcinoma. The *SCN8A* gene that encodes the α subunit of the Nav1.6 channel generates three alternative splicing variants in exon 18: 18A, 18N and $\Delta 18$. The $\Delta 18$ variant was localized in intracellular vesicles in macrophage cells (derived from leukemia) and melanoma, mediating the formation of invadopodia. Therefore, the goal of this project was to investigate the role of each Nav1.6 variant in the proliferation, migration and invasiveness of CeCa cell lines: SiHa, HeLa and C33A; which are positive to different types of HPV. To evaluate the role of each variant, specific siRNAs that reduce its expression level were used. The results showed a significant reduction in cell proliferation and invasiveness when the expression of the 18A and $\Delta 18$ variants was selectively decreased in the three cell lines. Cell proliferation is reduced between 70 and 80% by silencing 18A and $\Delta 18$ in the three cell lines; cell migration was only affected in SiHa cells and, on the other hand; invasiveness was reduced by 50% in SiHa cells by

decreasing the expression of the 18A variant, this same trend is observed in C33A, however, in HeLa cells that are the most invasive, it is the $\Delta 18$ variant that has an effect on invasiveness. Data suggest a differential effect of the 18A and $\Delta 18$ variants of the Nav1.6 channel on CeCa cell proliferation, migration and invasiveness. These findings allow us to propose the Nav1.6 channel and, in particular, the $\Delta 18$ variant as a therapeutic target in possible treatments against CeCa.

INTRODUCCIÓN

Epidemiología del cáncer

El cáncer es la segunda causa de muerte en todo el mundo, tan solo en 2020 se registraron 19.3 millones de casos nuevos y casi 10 millones de fallecimientos, de los cuales, cerca del 70% se registraron en países de ingresos bajos y medianos (Organización Mundial de la Salud, 2021). Se estima que para 2040 se dará un aumento del 47% de casos nuevos con respecto a 2020. Sin embargo, existe una enorme desigualdad entre la magnitud relativa del aumento de casos nuevos de cáncer en países con un índice de desarrollo humano (IDH) alto, medio y bajo, pues se calcula que el aumento para 2040 en países con un IDH medio será de 64% y para los de IDH bajo del 95% (Fig. 1; Sung *et al.*, 2021).

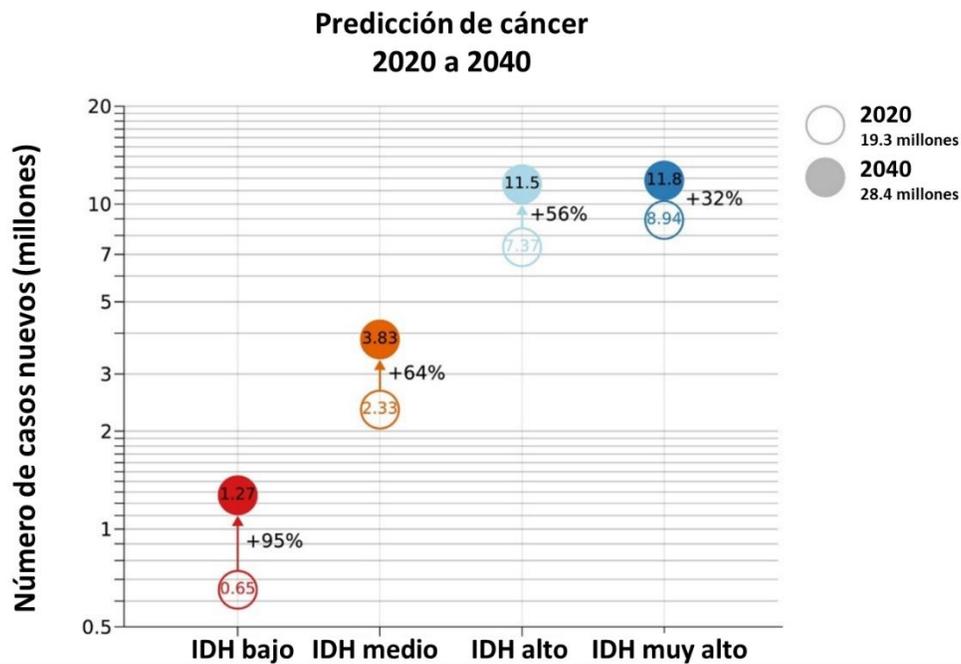


Figura 1. Número proyectado de casos nuevos de todos los tipos de cáncer (ambos sexos) para 2040. Se muestra el porcentaje de aumento con respecto a 2020 y de acuerdo con el índice de desarrollo humano (IDH) de 4 niveles. Modificado de Sung *et al.* (2021).

El cáncer es un término genérico que engloba a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del organismo, se caracteriza por la rápida multiplicación de células anormales (que presentan mutaciones o aberraciones cromosómicas) que pueden migrar e invadir localmente y a distancia nuevos tejidos y órganos del cuerpo, proceso denominado “metástasis”. La metástasis es la principal causa de muerte por cáncer (Organización Mundial de la Salud, 2021).

Cáncer cervicouterino (CaCu)

El cáncer cervicouterino (CaCu) es el cuarto cáncer más comúnmente diagnosticado (**Fig. 2A**) y la cuarta causa principal de muerte por cáncer (**Fig. 2B**) en mujeres mayores de 15 años; se estima que en 2020 hubo cerca de 604,035 casos nuevos y 341,790 muertes en todo el mundo. Además, la mayor incidencia y mortalidad de este tipo de cáncer se asocia con un IDH más bajo (GLOBOCAN, 2021; Organización Mundial de la Salud, 2021). En México, según los datos más recientes de GLOBOCAN (2021), el CaCu ocupa el segundo lugar en incidencia, con un estimado de 9,439 casos nuevos (**Fig. 3A**); y el segundo lugar en muertes asociadas con cáncer en mujeres mayores de 15 años con 4,335 muertes tan solo en 2020 (**Fig. 3B**).

En la mayoría de los casos, los tipos oncogénicos de alto riesgo del virus del papiloma humano (VPH) son la causa de la enfermedad. El VPH es el factor de riesgo más importante para desarrollar CaCu, ya que el DNA viral se encuentra presente en más del 99% de todos los casos de CaCu (de Freitas *et al.*, 2012; Steben *et al.*, 2007). Sin embargo, la presencia del virus es necesaria, pero no suficiente pues existen además otros factores que aumentan la probabilidad de que una infección por un VPH oncogénico se desarrolle en cáncer invasivo (Cohen *et al.*, 2019), tales como: tener una vida sexual activa desde temprana edad, múltiples parejas sexuales, mayor número de embarazos, uso prolongado de anticonceptivos hormonales (International Collaboration

of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, 2007), previa infección por *Chlamydia trachomatis* (Dahlström *et al.*, 2011) y el humo del tabaco (Roura *et al.*, 2014).

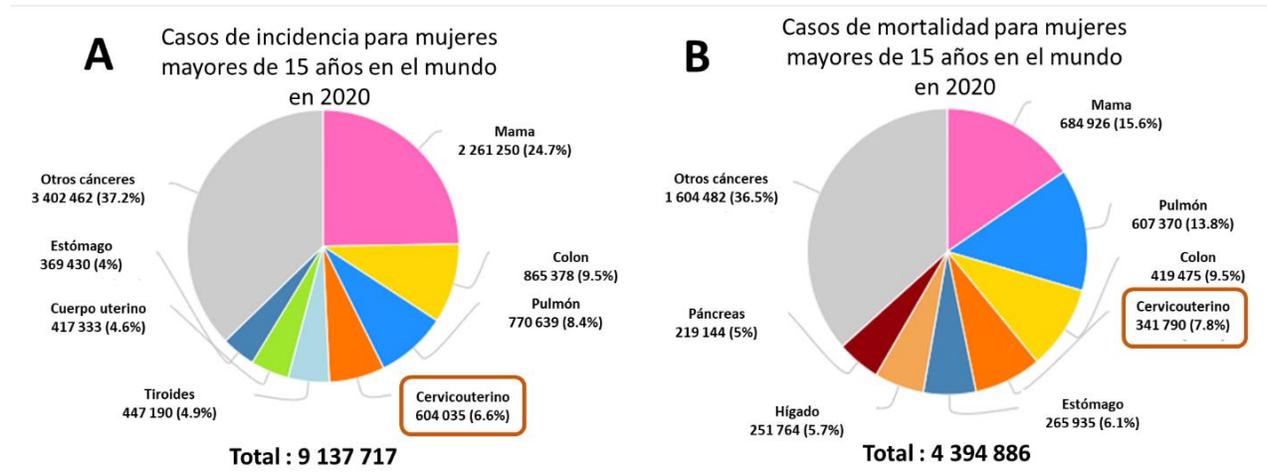


Figura 2. Porcentaje de incidencia (A) y mortalidad (B) de los principales tipos de cáncer en mujeres mayores de 15 años en todo el mundo para el año 2020. Modificado de GLOBOCAN (2021).

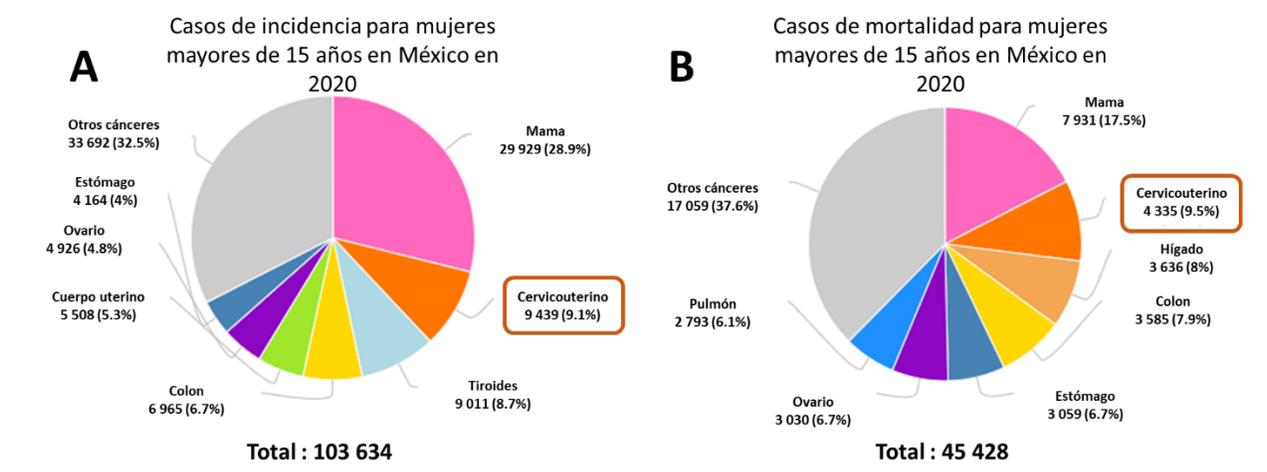


Figura 3. Porcentaje de incidencia (A) y mortalidad (B) de los principales tipos de cáncer en mujeres mayores de 15 años en México para el año 2020. Modificado de GLOBOCAN (2021).

Se han descrito cerca de 200 tipos de VPH, sin embargo, solo alrededor del 6% tiene el potencial para transformar las células del epitelio cervical en células cancerosas capaces de invadir otros tejidos. Entre los tipos de VPH oncogénicos destacan el VPH-16 que se encuentra en el 60% de los casos de CaCu y el VPH-18 presente en alrededor del 15% de los mismos (Schiffman *et al.*, 2016).

Debido a que el factor de riesgo crucial para el desarrollo del CaCu es un virus cuya transmisión es por vía sexual, se dice que es un tipo de cáncer que puede prevenirse, sin embargo, el uso del preservativo no es un método infalible y, en tanto más pronto sea el inicio de la vida sexual activa, más probable será la exposición a un VPH oncogénico. En 2006 se introdujeron las primeras vacunas bivalentes y tetravalentes (contra dos y cuatro tipos de VPH, respectivamente) dirigidas a niñas menores de 12 años con la finalidad de que generaran inmunidad antes del primer contacto con VPHs oncogénicos. En 2014, salió al mercado Gardasil 9, una vacuna que además de proteger contra los tipos oncogénicos más comunes (16, 18, 31, 33, 45, 52, y 58), también lo hace contra los dos tipos causantes de verrugas genitales más encontrados (6 y 11) (Cohen *et al.*, 2019).

En México fue hasta 2012 que se incluyó en el esquema nacional la vacuna contra el VPH, el cual consiste actualmente en la aplicación de dos dosis de la vacuna a niñas de quinto año de primaria u 11 años de edad (Instituto Nacional De Salud Pública, 2020).

A pesar de que los programas de vacunación contra el VPH ofrecen un panorama muy prometedor para reducir la incidencia del CaCu, el efecto no será evidente durante muchos años debido al periodo de latencia entre la infección crónica por VPH y el inicio del cáncer, el cual puede ir de 10 a 20 años (Cohen *et al.*, 2019) y, además, otros tipos de VPH oncogénicos para los cuales no hay vacunas podrían comenzar a volverse más incidentes en la población. Por lo anterior, es imprescindible contar con estrategias de detección temprana eficientes, así como también con blancos terapéuticos sumamente específicos ya que, actualmente, los tratamientos contra el CaCu incluyen intervención

quirúrgica (*e.g.* conización, histerectomía), radioterapia y quimioterapia, pero estos procedimientos no reflejan un incremento de la tasa de supervivencia entre las pacientes (Cohen *et al.*, 2019).

De manera interesante, durante los últimos 25 años se han reportado diversos estudios que relacionan las características distintivas del cáncer como la autosuficiencia en señales de crecimiento (*e.g.* PDGF, TGF- α , TGF- β), insensibilidad a las señales de anticrecimiento (*e.g.* pRb, p107, p130), invasión y metástasis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida y evasión de la apoptosis con la función de cierto tipo de proteínas que se encuentran en la membrana de prácticamente todos los tipos celulares descritos a la fecha y que se conocen con el nombre de canales iónicos (**Fig. 4**). En particular, los canales de sodio activados por voltaje (canales Nav) han sido ampliamente reportados en diversos tipos de cáncer asociándolos con la invasión y metástasis (Angus y Ruben, 2019; Djamgoz *et al.*, 2019; Fraser y Pardo, 2008; Lopez-Charcas *et al.*, 2021). Además, recientemente se ha reportado que el canal de sodio Nav1.6 que se sobreexpresa en cáncer folicular de tiroides, juega un papel importante en la proliferación celular (Li *et al.*, 2022).

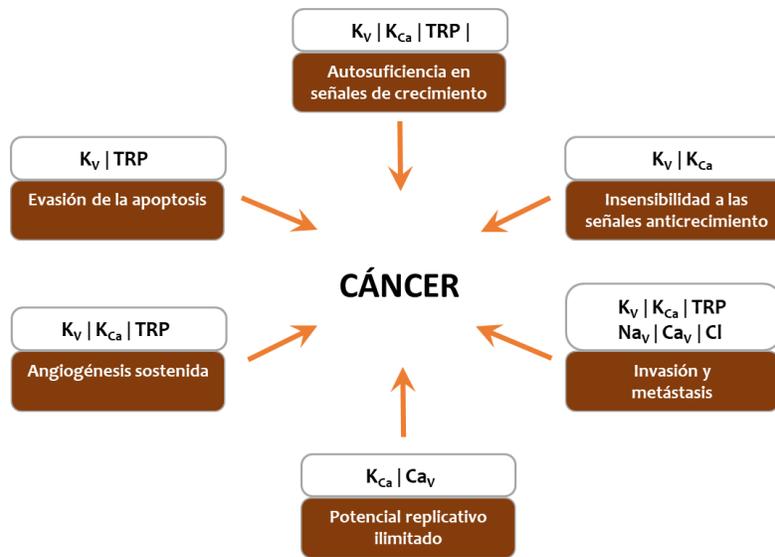


Figura 4. Cáncer y canales iónicos. Diagrama esquemático que ilustra los tipos de canales iónicos que se han asociado con las características distintivas del cáncer. Modificado de Fraser y Pardo (2008).

Canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas que permiten el flujo rápido de iones a través de las membranas celulares. Cuando los iones fluyen a través de la membrana se genera una corriente que, a su vez, genera una diferencia de potencial a través de la membrana celular (V_m). Dos fuerzas extrínsecas actúan limitando la tasa a la que los iones pueden fluir: el gradiente de concentración del ion y el gradiente eléctrico. Los cambios en la distribución de cargas (Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Cl^- , principalmente) son necesarios para mantener la homeostasis celular (Lipscombe, 2001). Los canales iónicos tienen diversas funciones que van desde la generación y propagación de señales eléctricas en células excitables (neuronas, células musculares y algunas células liberadoras de hormonas) hasta la regulación del volumen celular y la liberación local de Ca^{++} en el citoplasma que controla la expresión génica a través de distintas vías de señalización (Hille, 2001; Lipscombe, 2001).

En 1952, Hodgkin y Huxley determinaron las bases iónicas del potencial de acción mediante técnicas de fijación de voltaje que les permitió medir cambios en la

conductancia y permeabilidad relativa de los iones Na^+ y K^+ a través de la membrana plasmática del axón gigante del calamar. Así dedujeron que el potencial de acción era generado por la regulación precisa de la apertura y cierre de las conductancias a dichos iones; identificados más tarde como canales de Na^+ y K^+ activados por voltaje. Es por ello que canónicamente los canales iónicos activados por voltaje se asocian con su papel en la generación de señales bioeléctricas rápidas como los potenciales de acción y la contracción muscular (Hille, 2001).

Canales de sodio activados por voltaje

En condiciones fisiológicas, los canales de sodio activados por voltaje (canales Nav) transportan selectivamente iones sodio (Na^+) hacia el interior de la célula, permitiendo que el interior de la membrana celular se vuelva más positivo con respecto al exterior (despolarización). Esta despolarización conduce a la generación y propagación de potenciales de acción en células excitables (Yu y Catterall, 2003). La familia de canales Nav consta de nueve tipo de subunidades α : Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.5, Nav1.6, Nav1.7, Nav1.8 y Nav1.9; y cuatro subunidades β : Nav β 1, Nav β 2, Nav β 3 y Nav β 4. Cada canal está formado por una subunidad α , la cual forma el poro del canal, y una o dos subunidades β (Fig. 5) (Catterall *et al.*, 2003).

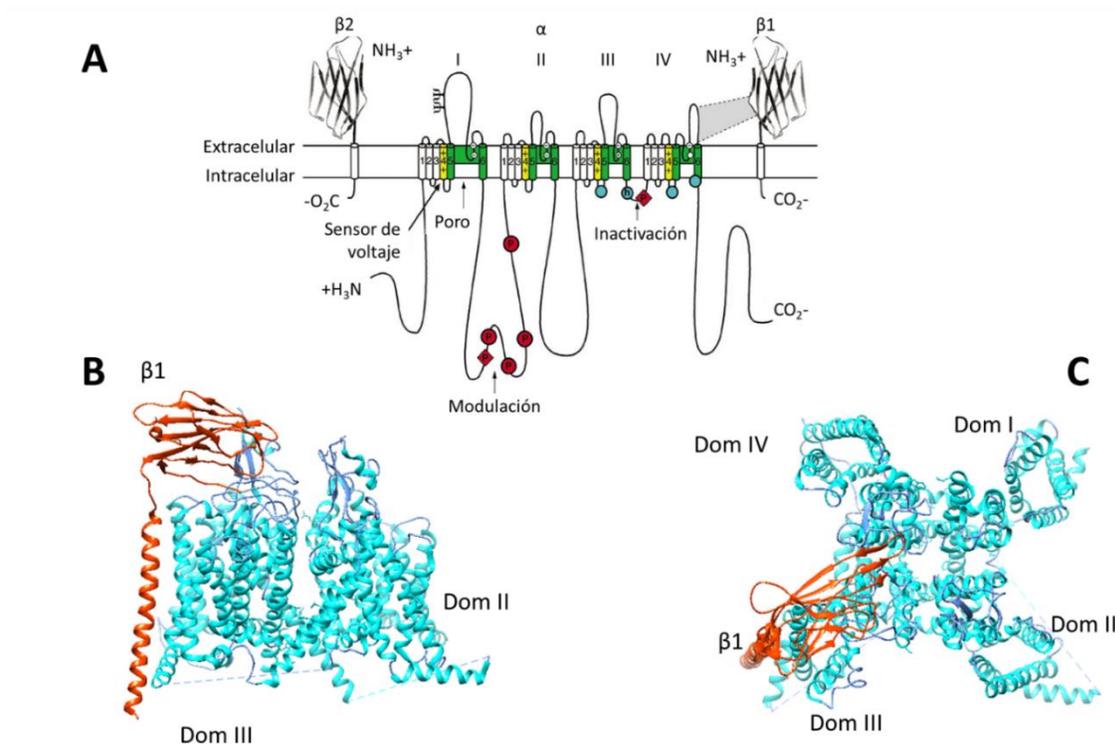


Figura 5. Representación esquemática y estructura tridimensional de las subunidades que conforman los canales Nav. (A) Se ilustran los cuatro dominios de la subunidad α (I-IV) y los seis segmentos de cada uno de éstos (S1-S6). Los segmentos S5 y S6 (verde) recubren el interior del poro y contienen al filtro de selectividad. Los segmentos S4 (amarillo) forman los sensores de voltaje. Los círculos azules en las asas intracelulares de los dominios III y IV indican el motivo isoleucina-fenilalanina-metionina (IFM) de la puerta de inactivación (h). P indica sitios de fosforilación (círculos, cinasa A; rombos, quinasa C). Los extremos amino-terminales de las subunidades β se encuentran en la región extracelular y contienen un dominio similar a las inmunoglobulinas, mediante el cual interactúa con la subunidad α . (B) Vista lateral y (C) vista desde la parte extracelular de la estructura tridimensional del canal Nav1.4 en complejo con Nav β 1 de humano resuelta por crio-microscopía electrónica con resolución de 3.2 Å. Modificado de Catterall *et al.* (2003), PDB: 6AGF.

La subunidad α consta de cuatro dominios (I, II, III y IV) cada uno con seis segmentos transmembranales (S1-S6). Los segmentos S1-S4 conforman el dominio sensor de voltaje. En particular, el movimiento del S4 de cada dominio es el responsable de la apertura y, por ende, de la activación del canal, pues contiene los residuos de aminoácidos arginina y lisina (cargados positivamente, posicionados cada tres residuos) que en respuesta a la

despolarización de la membrana se mueven hacia la parte extracelular por una fuerza de repulsión electrostática (Angus y Ruben, 2019). Por otro lado, los segmentos S5 y S6 recubren el interior del poro del canal, que a su vez constituye el filtro de selectividad. Se conoce como filtro de selectividad debido a que es capaz de distinguir entre iones de tamaño y carga similares. El anillo más interno del filtro de selectividad está formado por cuatro residuos de aminoácidos: aspartato, glutamato, lisina y alanina en los dominios I, II, III y IV, respectivamente. El asa intracelular que une los dominios III y IV conforman la compuerta de inactivación rápida, que inactiva al canal rápidamente poco después de su apertura (Angus y Ruben, 2019).

La subunidad α puede prescindir de la subunidad β y ser un canal Nav funcional, sin embargo, las subunidades β son importantes en la regulación del nivel de expresión del canal en la membrana plasmática y en la modulación de sus propiedades biofísicas. También se ha demostrado que tienen otras funciones como adhesión celular, regulación de la migración celular, agregación celular e interacción con el citoesqueleto (Isom, 2001; Salvage *et al.*, 2020).

Los canales Nav se expresan de forma diferencial en los diversos tejidos de los organismos; por ejemplo, Nav1.4 y Nav1.5 se expresan en músculo esquelético y cardíaco, respectivamente. Mientras que Nav1.1 a Nav1.3 y Nav1.6 son característicos del sistema nervioso central; y Nav1.7 a Nav1.9 del sistema nervioso periférico, principalmente (Angus y Ruben, 2019). Una manera de clasificar los canales Nav es considerando su sensibilidad a la tetrodotoxina (TTX), una neurotoxina del pez globo que bloquea selectivamente canales Nav (Narahashi, 2008). Los canales Nav1.1-Nav1.4, Nav1.6 y Nav1.7 son bloqueados por la TTX en concentraciones nanomolares (sensibles a TTX), mientras que Nav1.5, Nav1.8 y Nav1.9 son bloqueados con concentraciones micromolares (resistentes a TTX) (**Fig. 6**) (Lee y Ruben, 2008).

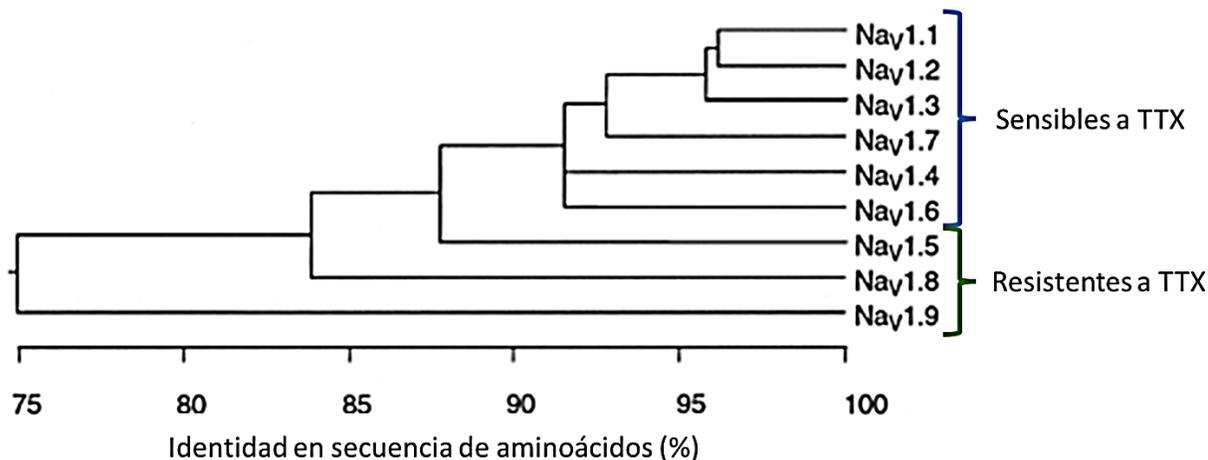


Figura 6. Porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos de las nueve isoformas de la subunidad α de los canales Nav. La comparación se realizó con Megalign en el programa DNASTar (utilizando el método Clustal). También se indica la clasificación de acuerdo con la sensibilidad al bloqueo por TTX. Modificado de Catterall *et al.* (2003).

Expresión alterada de las subunidades α de los canales Nav

En los últimos 25 años se han reportado una amplia gama de evidencias acerca de la regulación a la alza de diferentes canales Nav en múltiples tipos de cánceres con respecto al tejido no canceroso del cual se originaron (Lopez-Charcas *et al.*, 2021; Sanchez-Sandoval *et al.*, 2023). Por mencionar solo algunos ejemplos: Nav1.5 se sobreexpresa en líneas celulares de cáncer de mama (Fraser *et al.*, 2005) así como en líneas celulares y biopsias de cáncer de colon (House *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2017) y de ovario (Gao *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2018). De igual manera, Nav1.6 se sobreexpresa en el CaCu donde además se le asocia un papel importante en la invasión celular (Hernández-Plata *et al.*, 2012) y en cáncer folicular de tiroides donde se ha descrito que al reducir los niveles de mRNA con el empleo de siRNAs se reduce la proliferación celular (Li *et al.*, 2022). Por su parte, la expresión de Nav1.7 aumenta en cáncer de próstata (Diss *et al.*, 2001), pulmón (Campbell *et al.*, 2013) y de estómago (Xia *et al.*, 2016); otras isoformas también son reguladas a la alza en una variedad de linfomas y melanomas (Lopez-Charcas *et al.*, 2021). Además, en algunos cánceres se expresan isoformas neonatales generadas por empalme alternativo del mRNA, tal es el caso de la

isoforma Nav1.5 neonatal, cuya expresión y actividad impulsa el comportamiento invasivo en la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama humano que es altamente metastásica (Brackenbury *et al.*, 2007; Roger *et al.*, 2003). Asimismo, también se han reportado isoformas de canales Nav regulados a la baja como Nav1.6 en cáncer de colon (Igci *et al.*, 2015) y en sarcoma de Ewing (Hernandez-Muñoz *et al.*, 2016); y Nav1.7 en cáncer de colon (Pan *et al.*, 2017). De manera interesante, en muchos tipos de cáncer se ha observado que tanto la concentración de sodio intracelular como el potencial de membrana (V_m) aumentan sus valores con respecto a las células del mismo tejido no canceroso, es decir, las células cancerosas adquieren un V_m más despolarizado (James *et al.*, 2022; Yang y Brackenbury, 2013; Yang *et al.*, 2020).

Sin embargo, la presencia de un canal Nav específico no genera la transformación de un tejido no canceroso en canceroso, sino que estos podrían estar confiriendo a las células cancerosas una serie de ventajas que conllevan a una mayor supervivencia (Angus y Ruben, 2019).

ANTECEDENTES

En 2007 nuestro grupo de investigación (Díaz *et al.*) demostró por primera vez la expresión funcional de canales Nav en cultivos primarios de biopsias de CaCu humano positivas a VPH-16, mediante su caracterización electrofisiológica y molecular (Fig. 7). Los estudios electrofisiológicos mostraron corrientes típicas de canales Nav en respuesta a la aplicación de diferentes voltajes (Fig. 7A). En los tres cultivos primarios de células CaCu los picos de la corriente de Na⁺ (I_{Na}) aumentaron gradualmente de -40 a 0 mV, observándose una amplitud de corriente máxima a 0 mV, mientras que el potencial de inversión de la corriente (de entrante a saliente) se observó alrededor de los +40 mV (Fig. 7B), el cual fue consistente con el potencial de equilibrio teórico calculado para el ion Na⁺ en las condiciones de registro. Así mismo, la activación dependiente del voltaje de los canales Nav fue muy similar para los tres cultivos de CaCu (Fig. 7C). De manera interesante, cuando se midió la I_{Na} a 0 mV en presencia de diferentes concentraciones de TTX se observó que 1 μ M la bloqueaba por completo (Fig. 8A); además los valores de IC₅₀ en las curvas dosis-respuesta rondaban en las concentraciones nanomolares (Fig. 8B), lo que sugirió que los canales Nav responsables de dicha corriente son los denominados sensibles a TTX.

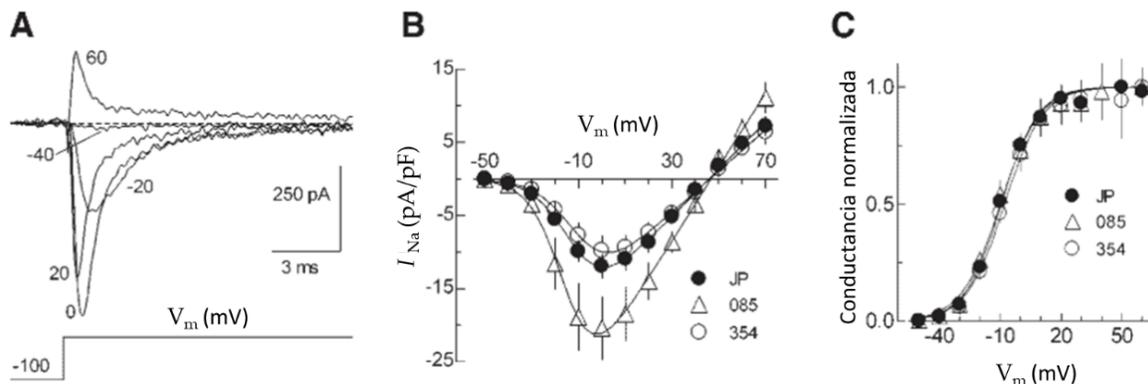


Figura 7. Activación dependiente de voltaje de la corriente de Na⁺. (A) Corrientes de Na⁺ representativas a los voltajes indicados desde un potencial de mantenimiento de -100 mV. (B) Curvas de corriente-voltaje y (C) Activación de la conductancia de Na⁺ de los cultivos primarios de CaCu indicados. Modificado de Díaz *et al.* (2007).

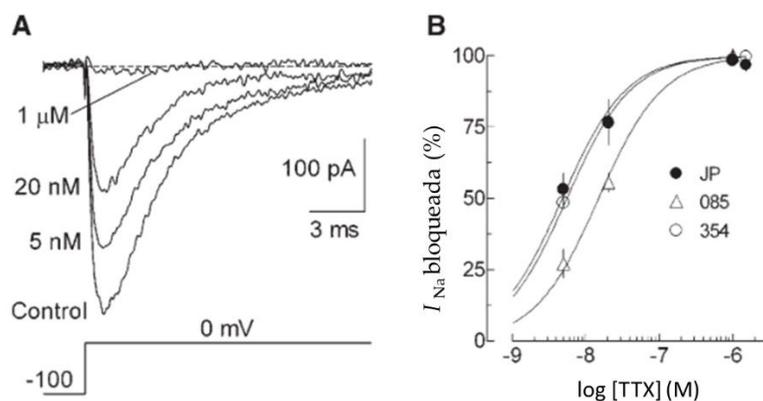


Figura 8. Sensibilidad a TTX de la corriente entrante en cultivos primarios de CaCu. (A) Trazos representativos de las corrientes entrantes a 0 mV en presencia de las concentraciones indicadas de TTX. (B) Curvas dosis-respuesta para el bloqueo de la corriente entrante en función de la concentración de TTX en las células CaCu. Valores IC_{50} : 4.8 nM para JP, 15 nM para 085 y 5.6 nM para 354. Modificado de Díaz *et al.* (2007).

Para dilucidar las isoformas que contribuyen a la corriente de Na^+ observada en los cultivos primarios de CaCu, nuestro grupo de investigación (Hernández-Plata *et al.*, 2012) investigó los niveles de expresión de los mRNAs de los canales Nav sensibles a TTX (Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.6 y Nav1.7). Los resultados obtenidos mediante qRT-PCR indicaron que la isoforma Nav1.6 se sobreexpresa alrededor de 40 veces más en biopsias de CaCu humano positivo a VPH-16 con respecto a las biopsias cervicales no cancerosas (CNC) (**Fig. 9A**). Además, se confirmó la presencia de la proteína mediante técnicas de inmunohistoquímica, lo que reveló la localización de Nav1.6 principalmente en la membrana plasmática de las células de biopsias CNC, mientras que, un tanto inesperadamente, en las biopsias de CaCu el canal se distribuye tanto en la membrana plasmática como en los compartimientos citosólicos, independientemente de la etapa de las biopsias estudiadas. Adicionalmente, demostraron que la sobreexpresión de Nav1.6 y la fuerte inmunoreactividad en las biopsias de CaCu tenía una contribución funcional en la corriente total de Na^+ de estas células, pues los experimentos de *patch-clamp* evidenciaron que al utilizar 1 μ M de la toxina Cn2 (un bloqueador específico de Nav1.6;

Schiavon *et al.*, 2006) se bloqueaba casi el 50% de dicha corriente (**Fig. 9B-C**). Además, mediante ensayos de invasión y migración celular, identificaron que Nav1.6 es la isoforma con la mayor contribución a la capacidad invasiva de las células de CaCu, sin afectar la migración celular (**Fig. 9D-E**; Hernández-Plata *et al.*, 2012).

Posteriormente, nuestro grupo de investigación profundizó en los mecanismos de señalización involucrados en el papel del canal Nav1.6 en la promoción de la capacidad invasiva en el CaCu utilizando las líneas celulares de CaCu: CaSki, SiHa y HeLa. Sin embargo, de manera sorpresiva, los experimentos de *patch-clamp* demostraron la ausencia de corrientes de canales Nav en la membrana plasmática en dichas células, no obstante que se detectaron niveles significativos del mRNA y de la proteína del canal.

De manera interesante, la expresión más evidente de la proteína del canal Nav1.6 se observó en membranas intracelulares (Lopez-Charcas *et al.*, 2018). Lo anterior se relaciona con el hallazgo de Carrithers *et al.* (2009) que describieron la presencia de una variante de empalme alternativo del gen que codifica para Nav1.6 en vesículas intracelulares con la probable función de mediar el control de podosomas y la formación de invadopodios en macrófagos y células de melanoma, respectivamente. A dicha variante se le conoce con el nombre de $\Delta 18$, ya que carece del exón 18 en su totalidad.

Los hallazgos de Carrithers *et al.* (2009) y Lopez-Charcas *et al.* (2018) son muy relevantes, pues se puede inferir que la variante $\Delta 18$ podría estar jugando un papel importante en las propiedades metastásicas del CaCu. Debido a esto, nuestro grupo de investigación se interesó por estudiar la participación de las variantes del canal Nav1.6 en el CaCu.

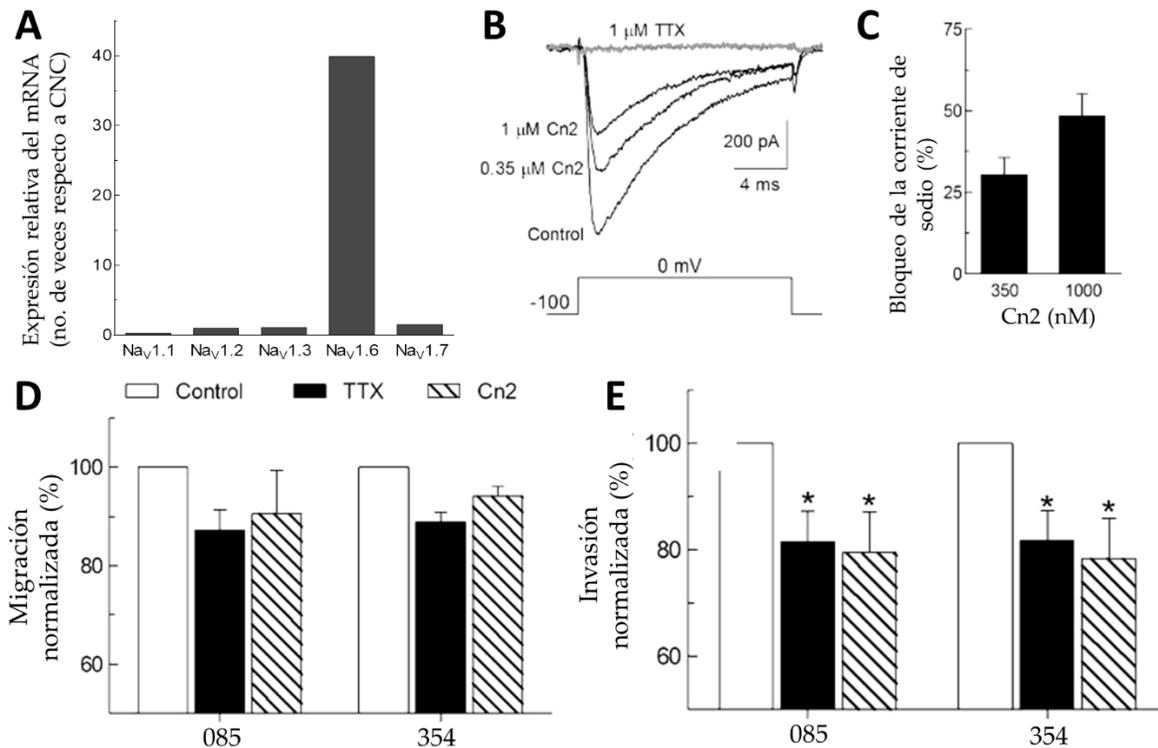


Figura 9. Participación del canal Nav1.6 en la capacidad invasiva del CaCu. (A) Niveles de expresión de las subunidades α de canales Nav en muestras de CaCu con respecto a tejido cervical no canceroso. Las barras muestran las proporciones de cambio promedio ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). (B) Corrientes representativas de Na^+ registradas a 0 mV en presencia de las concentraciones indicadas de Cn2 (un bloqueador específico de Nav1.6) y 1 μ M de TTX. (C) Porcentaje de bloqueo de la I_{Na} por 350 y 1000 nM de Cn2. (D) Migración e (E) invasión relativa de las células CaCu en presencia de 6 μ M de TTX o 1 μ M de Cn2 en comparación con el control (sin ninguna toxina). Modificado de Hernández-Plata *et al.* (2012).

La isoforma Nav1.6 es codificada a partir del gen *SCN8A* (Catterall *et al.*, 2005) y se sabe que éste presenta dos sitios de procesamiento alternativo de su mRNA: el primero en el exón 5, generando las variantes 5A y 5N (Sarao *et al.*, 1991); el segundo sitio es en el exón 18, generando las variantes 18A, 18N y Δ 18. La variante 18A (Adulta) comprende al mRNA con el exón 18 completo y se expresa funcionalmente en el cerebro y médula espinal adulta; la variante 18N (Neonatal) es una proteína no funcional (de solo dos dominios), pues presenta un codón de paro prematuro en el exón 18 alternativo (18N), esta variante se encuentra en el cerebro fetal y en tejido no neuronal; y, finalmente, la

variante $\Delta 18$ carece del exón 18, sin embargo, esta codifica para una proteína funcional que se expresa en algunos tejidos (**Fig. 10A**). Es de hacer notar que el exón 18 codifica para los segmentos transmembranales S3-S4 del dominio III, es decir, el sensor de voltaje de dicho dominio (**Fig. 10B**), por lo que es probable que su comportamiento dependiente del voltaje sufra modificaciones respecto a la variante completa (18A) (Plummer *et al.*, 1997).

En este sentido, Lopez-Charcas *et al.* (2018) estudiaron las variantes del exón 18 del gen *SCN8A* y observaron que las variantes 18N y $\Delta 18$ se expresan en todos los grupos de muestras estudiados, incluyendo las líneas celulares de CaCu (**Fig. 10C**), sin importar el tipo de VPH al que fueron positivas. Además, notaron que la sobreexpresión del gen *SCN8A* es una característica distintiva del CaCu invasivo, puesto que solo se sobreexpresa en biopsias de CaCu y no así en las muestras de neoplasias intraepiteliales cervicales (NICs) de bajo y alto grado, lo que apoya la hipótesis de que la expresión del gen se asocia con la transformación oncogénica de las células del epitelio cervical humano. Estos hallazgos sugieren que el canal Nav1.6 podría fungir como potencial marcador molecular en el CaCu.

Partiendo de estos antecedentes, otro estudio de nuestro grupo de investigación (Delgado Herrera, 2021) reportó los niveles de expresión de cada una de las variantes del procesamiento alternativo del exón 18 del gen *SCN8A* en líneas celulares de CaCu humano (**Fig. 11**). El estudio mostró que las líneas celulares SiHa (positivas a VPH-16) y C33A (negativa a VPH) de CaCu presentan niveles similares de expresión para las tres variantes del exón 18 del gen *SCN8A*, mientras que las células HeLa (positivas a VPH-18) presentan los niveles más bajos. Las células HeLa mostraron un nivel de expresión de la variante 18A de aproximadamente una tercera parte con respecto a las SiHa y C33A, mientras que las variantes 18N y $\Delta 18$ fueron casi imperceptibles en las células HeLa.

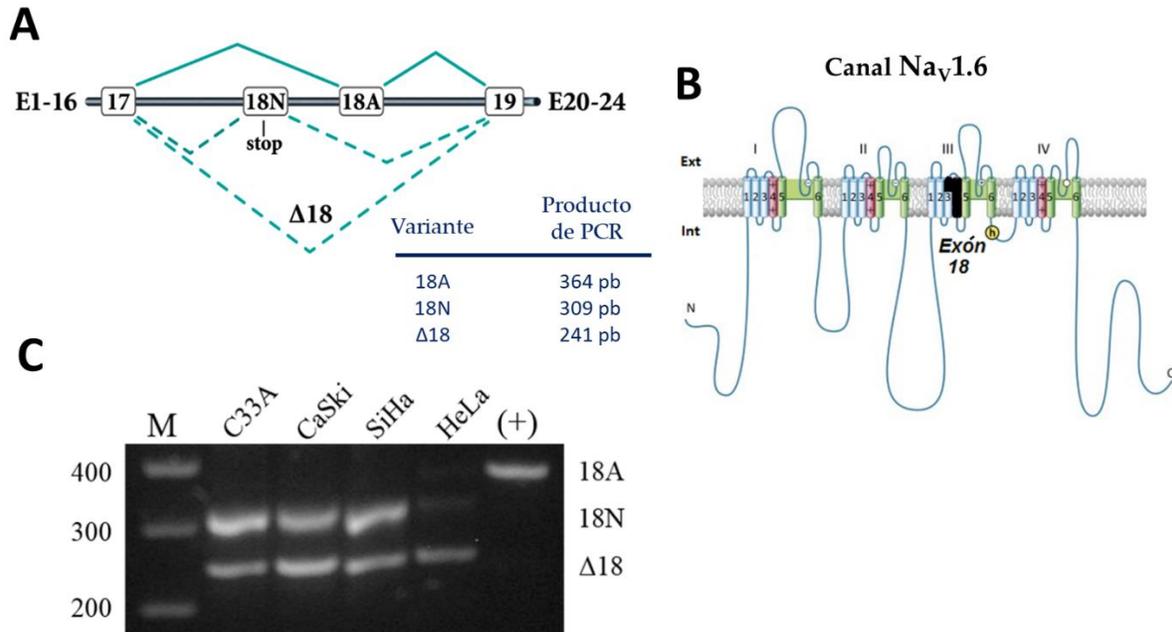


Fig. 10. Variantes del empalme alternativo del exón 18 del gen *SCN8A* en líneas celulares de cáncer cervicouterino. (A) Estructura genómica expandida de los exones 17 al 19 del gen *SCN8A*. El exón 18N contiene un codón de paro (*stop*) en su marco abierto de lectura. Las variantes de empalme alternativo del exón 18 se indican con la longitud del producto de PCR esperada mediante el uso de *primers* ubicados en los exones 17 y 19. (B) Representación esquemática del canal $Nav1.6$ donde se indica (con color negro) la fracción de la proteína que es codificada por el exón 18 del gen *SCN8A*. (C) Electroforesis que muestra los productos de PCR de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A* (18A, 18N y $\Delta 18$) expresadas en líneas celulares de cáncer cervicouterino (C33A, CaSki, SiHa y HeLa). Las células HEK-Nav1.6 se utilizaron como control positivo para la variante 18A (carril extremo derecho). Modificado de Lopez-Charcas *et al.* (2018).

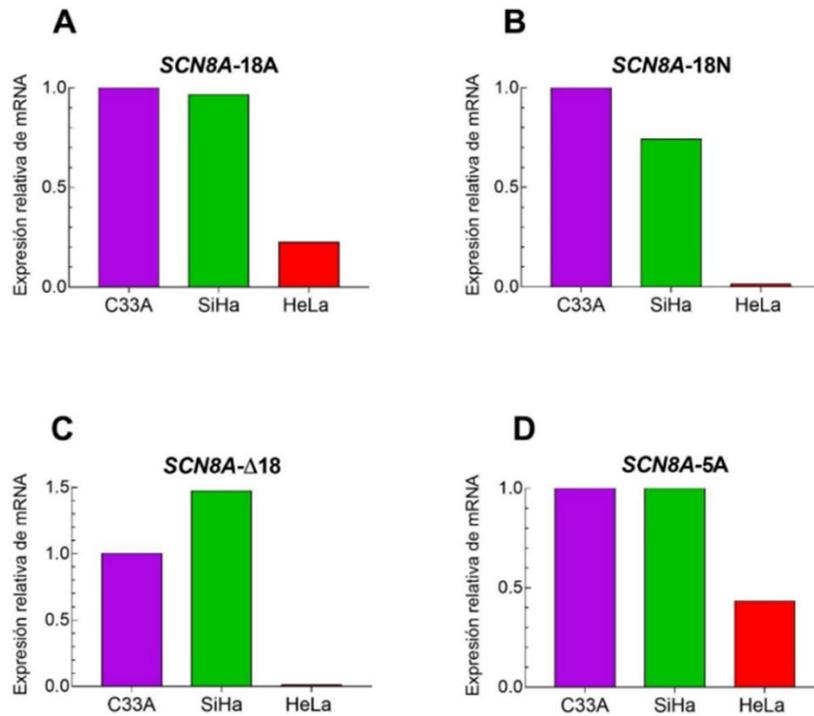


Figura 11. Expresión relativa de las variantes del gen *SCN8A* en las líneas celulares de CaCu positivas y negativas al VPH. Cambios en los niveles de mRNA (en número de veces) de las variantes del gen *SCN8A* en las células positivas al VPH-16 (SiHa) o al VPH-18 (HeLa) respecto a las células negativas a VPH (C33A). (A) Variante adulta (18A), (B) Variante neonatal (18N), (C) Variante delta 18 (Δ 18) y (D) Variante 5A (medida indirecta de la expresión de la variante 18A del gen *SCN8A*). Tomado de Delgado-Herrera (2021).

En resumen, la expresión relativa del mRNA de las tres variantes es más abundante en células de CaCu positivas a VPH-16 que en aquellas que presentan el tipo 18 del virus. Esto sugiere que la variante Δ 18 pudiera tener una contribución importante para la capacidad metastásica de las células SiHa. Asimismo, se ha reportado que las células HeLa presentan una capacidad metastásica más elevada que la observada en células SiHa (Sanchez-Sandoval y Gomora, 2019), pero esto no descarta la posible actividad pro-invasiva de la variante Δ 18 en el CaCu, como sabemos, las propiedades metastásicas de cualquier tipo de cáncer no son el resultado de un fenómeno unifactorial. Probablemente la capacidad metastásica de las células HeLa se deba a la participación

conjunta de la variante $\Delta 18$ con otras proteínas como la subunidad Nav $\beta 4$ que se ha encontrado regulada a la baja en el CaCu invasivo (Sanchez-Sandoval y Gomora, 2019).

El presente proyecto plantea resolver las interrogantes acerca de la contribución de cada una de las tres variantes del procesamiento alternativo del exón 18 del gen *SCN8A* en las propiedades metastásicas del CaCu.

HIPÓTESIS

La variante $\Delta 18$ del gen *SCN8A* aumentará las propiedades metastásicas de las líneas celulares de CaCu.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el nivel de contribución de cada una de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A* a la capacidad metastásica de células de CaCu.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Abatir la expresión de las tres variantes del exón 18 del gen *SCN8A* (18A, 18N y $\Delta 18$) en las tres líneas celulares de CaCu: SiHa, HeLa y C33A, mediante la utilización de siRNAs específicos.
- Investigar el efecto de los niveles de mensajero de las variantes *SCN8A*-18A, 18N y $\Delta 18$ en la proliferación, migración e invasividad celular de las tres líneas celulares de CaCu mencionadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para estudiar de manera individual la capacidad metastásica de cada variante del exón 18 del gen *SCN8A*, se utilizaron RNAs pequeños de interferencia (siRNAs) diseñados para silenciarlas específicamente. Primeramente, los siRNAs se transfectaron en las líneas celulares de CaCu y, posteriormente, se evaluó su capacidad de silenciamiento génico mediante la determinación cuantitativa de los niveles de expresión de cada variante usando la técnica de PCR en tiempo real (qPCR). Finalmente, se realizaron los experimentos de proliferación, migración e invasión celular bajo las condiciones de transfección con las que se obtuvo el mayor silenciamiento génico de cada variante y así investigar la contribución de cada una de las variantes a la capacidad metastásica del CaCu. Para un mayor entendimiento, en los siguientes párrafos se describen detalladamente las diferentes técnicas experimentales utilizadas en el presente proyecto.

Cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares de CaCu humano (**Tabla 1**) se obtuvieron originalmente de la *American Type Culture Collection* (ATCC; Manassas, VA, EUA). Las células HEK-293 que expresan de manera estable la variante adulta del gen *SCN8A* (HEK-Nav1.6), fueron donadas por *GlaxoSmithKline Research & Development Limited* (Stevenage, RU). Todas las células se mantuvieron almacenadas en nitrógeno líquido hasta que se requirió del descongelamiento de un vial de cada una de ellas para iniciar el cultivo celular.

Para descongelar las células de CaCu se retiró un vial de cada línea celular del tanque de nitrógeno y se colocaron en baño María (a 37 °C) durante 2 a 3 minutos. Una vez descongelada la suspensión celular, se resuspendió mediante pipeteo y se colocó en un tubo Falcon de 15 mL en un volumen final de 5 mL y se centrifugó a 1,000 rpm durante 7 min a 24 °C. Posteriormente, se aspiró el medio para eliminar el DMSO empleado en el congelamiento de células, las células precipitadas (*pellet*) se resuspendieron en 1 mL de medio y la suspensión celular se colocó en una caja de cultivo de 100 mm con 9 mL de

medio. A partir de aquí se comenzaron a hacer pasajes celulares en cajas de cultivo de 60 mm cuando la monocapa se encontraba a un 85-90% de confluencia (2 veces por semana). Las líneas celulares de CaCu se crecieron y mantuvieron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; GIBCO- Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) suplementado con 1 mM de piruvato de sodio, 25 mM de HEPES, 10% de suero fetal bovino (SFB), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (al cual llamaremos en adelante "medio CaCu suplementado") y permanecieron incubadas a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂.

Tabla 1. Líneas celulares de CaCu humano empleadas en este estudio.

	SiHa	HeLa	C33A
Organismo	<i>Homo sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
Tipo celular	Epitelial	Epitelial	Epitelial
Propiedad de crecimiento	Células adherentes	Células adherentes	Células adherentes
Tejido	Cuello uterino	Cuello uterino	Cuello uterino
Edad de la paciente	55	31	66
Etnicidad	Asiática	Afrodescendiente	Caucásica
Enfermedad	Carcinoma de células escamosas	Adenocarcinoma	Carcinoma
VPH	16	18	Negativo

Información de la *American Type Culture Collection*.

Para realizar los pasajes celulares, el medio de cultivo se retiró mediante aspiración con ayuda de una pipeta Pasteur y las células se lavaron con 2 mL de solución

amortiguadora de fosfatos o PBS (154 mM de NaCl, 3 mM de Na₂HPO₄ y 1.06 mM de KH₂PO₄, pH 7.2). Posteriormente, el PBS se retiró mediante aspiración y se agregaron 400 µL de una solución balanceada de Hanks libre de calcio con 0.05% de tripsina y 0.53 mM de EDTA, con la cual se dejaron incubar durante 5 a 7 min. Una vez pasado el tiempo de incubación, se agregó medio CaCu suplementado para inactivar la acción enzimática de la tripsina y, con ayuda de una pipeta serológica de 5 mL, las células se disociaron de manera mecánica para resembrarlas en otra caja de cultivo de 60 mm a una densidad 10 veces menor (esto fue variando conforme aumentaba el número de pases). Los cultivos celulares siempre se mantuvieron con un volumen final de 4 mL de medio CaCu suplementado.

En cuanto a la línea celular HEK-Nav1.6, esta fue crecida y mantenida con medio DMEM/F-12 y antibiótico G418 (4 µL por cada mL de medio de cultivo) como agente de selección de las células que expresan establemente la variante adulta del gen *SCN8A*.

Conteo celular

El conteo de células de CaCu y HEK 293 se realizó en cámara de Neubauer tiñendo a las células con azul de tripano y cuando estas se encontraban al 90-100% de confluencia en la caja de cultivo de 60 mm. La monocapa de células se despegó de la caja de cultivo siguiendo el procedimiento anteriormente descrito. A partir de la suspensión celular, se tomaron 20 µL y se transfirieron a un tubo Eppendorf donde se adicionaron 20 µL de azul de tripano (lo que corresponde a una dilución 1:2). Para el caso de C33A y HEK 293 el conteo se realizó haciendo una dilución más (1:4). A partir de la dilución correspondiente, se tomaron 10 µL y, por capilaridad, se colocaron entre la cámara de Neubauer y el cubreobjetos. En un microscopio óptico con objetivo 4X se enfocaron las células y, por cada línea celular, se realizaron 4 conteos y en cada uno se contaron las células de 5 cuadrantes. Los cálculos para determinar el número de células por mL se realizaron como se describe en la literatura (Electron Microscopy Sciences, 2021).

Estandarización del cultivo de células para la transfección con siRNAs

A partir de los datos obtenidos en el conteo celular y con la finalidad de optimizar la cantidad de células a cultivar para posteriormente ser transfectadas, se estudiaron diferentes cantidades de células a cultivar en cajas de 12 pozos, se realizaron extracciones de RNA, se cuantificó y se corroboró su integridad en geles de agarosa hasta encontrar la mejor condición en la que podía obtenerse RNA íntegro y en cantidad suficiente para las aplicaciones posteriores. Se decidió utilizar cajas de 12 pozos a partir de los cuales se obtiene la cantidad de RNA suficiente para los experimentos requeridos.

Para estos experimentos se partió siempre de cajas de cultivo de 60 mm a una confluencia del 90-100%; la monocapa de células se despegó de la manera habitual; se tomó la cantidad de suspensión previamente calculada para la cantidad de células deseada y se resuspendió en medio de cultivo nuevo en tubos Falcon™ de 15 mL. Con una pipeta serológica se distribuyó la suspensión celular en el medio de cultivo nuevo y se agregaron 1.1 mL de esta nueva suspensión celular a cada pozo de la caja multipozos. Después de 24 h de incubación en condiciones estándar, se realizó el cambio de medio de cultivo a cada uno de los pozos aspirando con una pipeta Pasteur el medio CaCu suplementado y adicionando, con precaución para no despegar la monocapa, medio de cultivo sin antibiótico ni suero fetal bovino (para simular las condiciones en las que se realizarían las transfecciones). A las 24, 48 y 72 h del cambio de medio de cultivo se realizaron extracciones de RNA. Cada muestra de RNA se cuantificó y se visualizó en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Estos ensayos se realizaron en repetidas ocasiones hasta encontrar las condiciones adecuadas para comenzar con las transfecciones.

Evaluación de la eficiencia de transfección con siRNAs

Una vez establecida la cantidad de células a sembrar para realizar las transfecciones, se sembraron células SiHa, HeLa y C33A en cajas de 12 pozos para investigar cualitativamente la eficiencia con la que los siRNAs podían ingresar a la célula con el reactivo de transfección X-treme GENE 360 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Para ello, se utilizó el indicador de transfección *siGLO green* (Thermo Fisher Scientific) que consiste en oligonucleótidos de doble cadena marcados con un fluoróforo (6-FAM) que permite, mediante microscopía de epifluorescencia, distinguir las células que han sido transfectadas. La transfección se realizó 24 h después de la siembra (usando siempre medio CaCu sin antibiótico ni SFB) con una concentración final de 50 nM de *siGLO green* en cada pozo y siguiendo las indicaciones del fabricante del reactivo de transfección empleado. Después de 24 h de la transfección, las células se lavaron con PBS y se resembraron en cajas de cultivo de 35 mm con dos cubreobjetos de 1 cm² en el fondo. Las células se incubaron durante 12 h en condiciones estándar de cultivo y posteriormente se observaron en un microscopio confocal LSM 800 con objetivo 20X y se tomaron las fotografías correspondientes. Estos experimentos de microscopía se realizaron en la Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular.

Extracción de RNA total

La obtención del RNA total de cada una de las líneas celulares en cada experimento se realizó con el reactivo TRIzol (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) siguiendo el protocolo del fabricante para células adherentes. Todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad en el cuarto de cultivo para evitar posibles fuentes de contaminación con RNAsas y en el cuarto frío (4 °C) cuando se requería centrifugación con el fin de no incrementar drásticamente la temperatura de las muestras. Para comenzar con la extracción, primero se aspiró el medio de cultivo con una pipeta Pasteur y se adicionó la cantidad correspondiente de reactivo TRIzol; una

vez que las células fueron levantadas y homogeneizadas se transfirió toda la suspensión a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se incubó en TRIzol durante 5 min. Posteriormente, se adicionó cloroformo (200 μ L por cada mL de TRIzol), el cual permite la separación del homogeneizado en tres fases: una fase acuosa superior que contiene al RNA, una interfase y una fase orgánica inferior que contiene DNA y proteínas. Las muestras se incubaron con el cloroformo durante 3 min y después se centrifugaron a 11,000 rpm durante 15 min. Acto seguido, se aspiró la fase acuosa superior con mucho cuidado y se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo, al cual se adicionó isopropanol al 100% (500 μ L por mL de Trizol), y se incubaron durante 10 min a 4°C para facilitar la precipitación del RNA. Después se realizó una segunda centrifugación a 11,000 rpm durante 10 min con el fin de precipitar el RNA en un *pellet* al fondo del tubo. El isopropanol se retiró por decantación y el *pellet* se resuspendió mediante pipeteo con etanol al 75%, se centrifugó a 9,000 rpm durante 5 min y el etanol se retiró por decantación. Este procedimiento de lavado con etanol al 75% se repitió una vez más y se dejó secar el *pellet* de RNA invirtiendo el tubo dentro del gabinete de bioseguridad. Una vez que el etanol se evaporó, el RNA se diluyó en agua Mili-Q estéril libre de RNasas y se almacenó a -80 °C para su uso posterior.

El RNA obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific), para ello, se realizaron tres mediciones con 1 μ L de muestra por cada medición y se obtuvo el promedio de concentración de cada RNA con los cuales se realizaron los cálculos para los experimentos posteriores. Durante la cuantificación del RNA también se obtuvieron los cocientes 260/280 y 260/230. La integridad del RNA se corroboró con electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Cuando fue necesario las muestras se trataron con DNasa antes de continuar con la reacción de transcripción inversa del DNA.

Transcripción inversa del DNA

Como primer paso para la identificación y cuantificación de genes expresados (es decir, la presencia de mRNA en las muestras de interés) se requiere la obtención de DNA complementario (cDNA), ya que a partir de este se lleva a cabo la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). Para la obtención de cDNA a partir del RNA se requiere el empleo de la enzima transcriptasa reversa, la cual utiliza como molde el mRNA e introduce y polimeriza nucleótidos de DNA complementarios. Para esta reacción de transcripción inversa se utilizó el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific) en un volumen final de 20 μL que incluyó: 2 μL de 10X RT *Buffer*, 0.8 μL de 25X dNTP Mix (100 mM), 2 μL de 10X RT *Random Primers*, 1 μL de Transcriptasa Reversa MultiScribe™ MuLV, agua Mili-Q estéril y RNA. Las cantidades de estos dos últimos se calcularon de tal manera que se usaran 3 o 1.5 μg de RNA total (según la cantidad disponible) y la cantidad de agua Mili-Q necesaria para llevar la reacción a un volumen final de 20 μL . La reacción se llevó a cabo en un termociclador programable de 96 pozos Veriti (Applied Biosystems) y el ciclo térmico consistió en tres etapas: la primera que corresponde a la fase de hibridación de los *primers*, se llevó a cabo a 25°C durante 10 min; la segunda que es la etapa donde ocurre la síntesis del cDNA, tuvo lugar a 37°C durante 120 min; y la tercera etapa de 5 min a 95°C en la cual se detiene la transcripción. El cDNA obtenido se almacenó a 4°C.

PCR en tiempo real (qPCR)

Mediante esta técnica se realizó la amplificación del cDNA obtenido en la reacción de la transcripción inversa. Esta modalidad de PCR tiene el mismo principio que la PCR estándar, pero detecta la amplificación del cDNA mediante el empleo de moléculas con propiedades fluorescentes que se asocian al cDNA de interés y, conforme la reacción avanza, la fluorescencia de la sonda alcanza un nivel umbral que es detectado y

cuantificado por el equipo. Existen varias maneras de cuantificar mediante qPCR según la molécula que se emplee para emitir la fluorescencia (Shipley, 2006), en los ensayos de este trabajo se utilizaron sondas *TaqMan*® (Tabla 2; Fig. 12).

Tabla 2. Características de los ensayos *TaqMan*® que se utilizaron en las reacciones de qPCR.

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

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

Como primer paso para realizar todos los ensayos de qPCR, se buscó estandarizar la cantidad de sonda a utilizar en los experimentos subsecuentes. Para ello se midió la expresión de los genes *HPRT-1* con sonda FAM (que emite en color verde) y con sonda VIC (que emite en color amarillo) y el gen *18S* con sonda VIC. Cada ensayo se evaluó adicionando 0.3 o 0.5 μL de este a la reacción de qPCR, esto con la finalidad de encontrar si existe diferencia entre agregar una u otra cantidad de sonda y, de no hallar diferencias, utilizar la menor cantidad. La expresión de estos genes se cuantificó en el cDNA obtenido de células HEK-Nav1.6.

	1	21	41	61	81					
SCN8A-18A	AAGTGGACAG	CCTATGGCCT	CGTCAAGTTC	TTCACCAATG	OCTGGTGTG	GCTGGACTTC	CTCATTGTGG	CTGTCTCTTT	AGTCAGCCTT	ATAGCTAATG
SCN8A-18N	AAGTGGACAG	CCTATGGCCT	CGTCAAGTTC	TTCACCAATG	OCTGGTGTG	GCTGGACTTC	CTCATTGTGG	CTGTACCAAT	AAATTTGTCT	GGCTTAATTT
SCN8A-Δ18	AAGTGGACAG	CCTATGGCCT	CGTCAAGTTC	TTCACCAATG	CGTGGTGTG	GCTGGACTTC	CTCATTGTGG	CTGT.....
	101	121	141	161	181					
SCN8A-18A	CCCTGGGCTA	CTGGTGGCG	CCATCCCTC	CATCATGAAT	GTGCTGCTGG	TGTGTCTCAT	CTTCTGGCTG	ATTTTCAGCA	TCATGGGAGT	TAACTTGTTT
SCN8A-18N	AATGGGGA..
SCN8A-Δ18
	201	221	241	261	281					
SCN8A-18A	GGTGAATGCC	TTGGTGGGCG	CCATCCCTC	CATCATGAAT	GTGCTGCTGG	TGTGTCTCAT	CTTCTGGCTG	ATTTTCAGCA	TCATGGGAGT	TAACTTGTTT
SCN8A-18N	GGTGAATGCC	TTGGTGGGCG	CCATCCCTC	CATCATGAAT	GTGCTGCTGG	TGTGTCTCAT	CTTCTGGCTG	ATTTTCAGCA	TCATGGGAGT	TAACTTGTTT
SCN8A-Δ18	GGTGAATGCC	TTGGTGGGCG	CCATCCCTC	CATCATGAAT	GTGCTGCTGG	TGTGTCTCAT	CTTCTGGCTG	ATTTTCAGCA	TCATGGGAGT	TAACTTGTTT

Figura 12. Alineamiento de las secuencias de las variantes 18A, 18N y Δ18 del gen SCN8A. Se muestra en colores verde, azul y rojo las regiones donde se hibridan los *primers* en las variantes 18A, 18N y Δ18, respectivamente. Adicionalmente, con amarillo se resaltan las regiones en donde se hibridan las sondas *TaqMan*® en cada variante. En el alineamiento se muestran los últimos 71 pb del exón 17, el exón 18 completo y los primeros 172 pb del exón 19 de la secuencia codificante del gen *SCN8A* de *Homo sapiens* (GenBank AH007414.2).

Rangos dinámicos

Con la finalidad de estandarizar los ensayos de qPCR para la variante 18A se utilizó el cDNA obtenido de las células HEK-Nav1.6 que expresan de manera estable la forma adulta del canal Nav1.6 (Burbidge *et al.*, 2002) y se buscó detectar la presencia del mRNA de la variante 18A así como la expresión del gen constitutivo *HPRT-1* FAM, el cual se utilizó siempre en estos ensayos como gen endógeno de referencia. Las reacciones de qPCR se realizaron por duplicado en un volumen final de 15 µL el cual incluyó: 1 µL de cDNA molde diluido (*stock*, 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16), 7.5 µL de 2x *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific), 0.3 µL de 20X *Custom TaqMan® Gene Expression Assay* (Applied Biosystems) y 6.2 µL de agua Milli-Q estéril.

Las reacciones de qPCR se realizaron en el termociclador *Rotor-Gene Q* (Qiagen; Hilden, Alemania), acoplado a una computadora que contiene el programa *Rotor-Gene® Q Software* versión 2.1.0.9 para la adquisición y análisis de resultados. Las condiciones de ciclo térmico fueron las siguientes: una etapa de activación a 50 °C durante 2 min, una etapa de desnaturalización a 95 °C durante 10 min y, finalmente, 45 ciclos con dos fases: desnaturalización a 95 °C durante 15 s e hibridación y elongación a 60 °C durante 1 min.

Una vez terminado el ciclado, dentro del mismo programa se realizaron las correcciones y se estableció manualmente un valor umbral de emisión de fluorescencia, a partir de esto, el programa proporcionó, para cada una de las muestras analizadas, los valores de Ct, los promedios de los duplicados y la desviación estándar de estos. El Ct (*threshold cycle*) puede definirse como el número de ciclos requeridos para que la señal fluorescente sobrepase el valor umbral, de tal manera que entre menor sea la cantidad relativa de cDNA correspondiente a un determinado mRNA, se necesitará un mayor número de ciclos para alcanzar dicho umbral (Shipley, 2006). Todos los datos proporcionados por el programa se exportaron en archivos Excel para su posterior análisis.

En el programa GraphPad Prism 8 se graficaron los valores promedio de Ct (variable dependiente) y el Log_{10} de la concentración de cDNA (variable independiente), se ajustaron a un modelo de regresión lineal y se obtuvo la ecuación de la recta en su forma $y=mx+b$, donde m es el valor de la pendiente, el cual sustituyó a S para calcular la eficiencia de la reacción mediante la siguiente ecuación: $E = 10^{-\frac{1}{S}} - 1$.

Transfección con siRNAs

Para el silenciamiento de la expresión génica se utilizaron siRNAs diseñados específicamente para abatir la expresión de cada variante (**Tabla 3**). Los siRNAs son pequeños RNAs de doble cadena de origen exógeno que se unen por complementariedad de bases al mRNA y provocan su degradación (Ortiz-Quintero, 2009). Se evaluaron diferentes concentraciones de siRNA (25, 50, 100, 150 y 300 nM) para silenciar a la variante adulta del exón 18 del gen *SCN8A* y se utilizaron dos siRNAs para abatir la expresión de la variante $\Delta 18$; además se evaluó el efecto de un siRNA dirigido contra el exón 19 del gen *SCN8A* para abatir la expresión de todas las variantes de este gen. Las transfecciones se realizaron en cajas de 12 pozos cultivando a las células 24 h

antes de la transfección y cambiando el medio CaCu suplementado por medio CaCu sin antibiótico ni SFB 30 m antes de transfectar. La preparación del complejo de transfección se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. En tubos Eppendorf se colocó medio CaCu sin antibiótico ni SFB y en éste se diluyó la cantidad de siRNA requerida para obtener la concentración deseada en el volumen final del pozo; posteriormente, se agregó la cantidad sugerida del reactivo de transfección X-treme GENE 360 y se mezcló delicadamente mediante pipeteo. El complejo de transfección se incubó a temperatura ambiente durante 30 min, luego, mediante goteo, se agregó la cantidad correspondiente a cada pozo y las cajas se movieron levemente de lado a lado para favorecer una distribución uniforme del complejo. Como control del silenciamiento se transfectaron células con un siRNA “nonsense”, es decir, que no tiene ningún mRNA blanco. Después de 6 h de la transfección se cambió el medio de transfección por medio CaCu suplementado. Se realizaron extracciones de RNA a diferentes tiempos postransfección y el RNA obtenido se cuantificó y se corroboró su integridad con geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio para posteriormente, realizar las reacciones de transcripción inversa del DNA y la evaluación cuantitativa del silenciamiento mediante qPCR.

Tabla 3. Secuencias blanco de los siRNAs contra cada variante del exón 18 del gen SCN8A.

siRNA	Secuencia blanco (5'--> 3')
Variante 18A	GCCATAAAGTCCCTTAGGA
Exón 19	GATACCTGGCCCTTCTTCA
Variante Δ18-1	CCTCATTGTGGCTGTGGT
Variante Δ18-2	CATTGTGGCTGTGGTGGT

Ensayos de Proliferación

El análisis de la capacidad de proliferación de las células de CaCu en condiciones basales, así como bajo el efecto del abatimiento diferencial de la expresión de las

variantes del exón 18 del gen *SCN8A* se llevó a cabo en cajas de 48 pozos, cultivando una cantidad inicial de 5,000 células. A partir de una misma suspensión celular, las células se cultivaron 12 h antes de la transfección para permitir su adhesión y morfología habitual. Se evaluó la proliferación en cuatro condiciones: control (con siRNA *nonsense*), con siRNA *vs SCN8A-18A*, con siRNAs *vs SCN8A-Δ18* (cotransfección de los siRNAs $\Delta 18-1$ y $\Delta 18-2$) y con siRNAs *vs SCN8A-18A* y *SCN8A-Δ18* (cotransfección de los tres siRNAs) a una concentración final de 100 nM de cada siRNA. Para cada condición por duplicado, se añadió reactivo de MTT (Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazoil)-2,5-difeniltetrazólico; Roche; Mannheim, Alemania) al 5% luego de 6, 24, 48 y 72 h de realizada la transfección y se incubó durante 3 h a 37 °C en una atmósfera con el 5% de CO₂. Posteriormente, se retiró mediante succión el medio de cultivo para eliminar el exceso de MTT que no fue metabolizado y se agregaron 200 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) para disolver las sales de formazán generadas intracelularmente por la captación y reducción del MTT. Finalmente, se cuantificó la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 562 nm en un espectrofotómetro Eppendorf AG 22331 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Paralelamente, se cuantificó la proliferación mediante conteo celular (en cámara de Neubauer) de células sin transfectar para observar el crecimiento de cada línea celular en el tiempo.

Ensayos de Migración

La capacidad de migrar de las células CaCu en condiciones basales y con siRNAs para el abatimiento de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A* se evaluó mediante el ensayo de cierre de “herida” (Cory, 2011). Para ello, a partir de una misma suspensión celular se cultivaron 100,000 células (para SiHa y HeLa) o 250,000 células (C33A) para que el cultivo celular presentara el 90% de confluencia en cajas de 48 pozos 12 h antes de la transfección con siRNAs. Las cuatro condiciones evaluadas fueron las mismas que se

describen para los ensayos de proliferación. Para cada condición por duplicado se adicionó mitomicina C (para arrestar el ciclo celular) a las 6 h de la transfección a una concentración final de 12 μ M y se incubaron durante 2 h (4 h para el caso de células HeLa) a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂. Posteriormente, se realizó una “herida” por pozo con una punta estéril de micropipeta de 10 μ L (para el caso de células HeLa se utilizó una punta de 200 μ L), se lavó dos veces con PBS para eliminar restos celulares y se agregó medio CaCu con 5% de SFB. Adicionalmente, se incluyeron controles positivos que consistieron en células transfectadas con siRNA *nonsense*, sin tratamiento con mitomicina C y que, después de la “herida”, se mantuvieron en medio CaCu suplementado con 10% de SFB. Esto para brindar las mejores condiciones para el cierre de “herida” tanto por migración como por proliferación celular. En un microscopio automatizado ImageXpress (Laboratorio Nacional de Canalopatías) se tomaron fotografías inmediatamente después de realizada la “herida” y a las 24, 48 y 72 h post-“herida”. La migración se evaluó midiendo el área de la “herida” a través del tiempo en el procesador de imágenes Fiji (NIH; Bethesda, MD, EUA).

Ensayos de Invasión celular

Estos ensayos se basan en el principio de la cámara de Boyden, el cual consta de dos cámaras separadas por una membrana de polietileno con poros de 8 μ m que es recubierta con Matrigel™ (Corning; NY, EUA) (**Fig. 13**). El Matrigel™ es un material que simula el ambiente extracelular dado que está compuesto por proteínas (laminina y colágeno IV) y factores de crecimiento epidermal y fibroblástico característicos de este ambiente (Chen, 2005). Primeramente, los insertos fueron preparados con 50 μ L de Matrigel™ a una concentración de 0.3 mg/mL y se incubaron toda la noche en condiciones estándar de cultivo. Paralelamente, se transfectaron 100,000 células (para los casos de SiHa y HeLa) o 300,000 células C33A en cajas de 6 pozos para cada una de las cuatro condiciones experimentales descritas previamente. Después de 24 h de la

transfección, los insertos con MatrigelTM fueron hidratados con 50 μ L de medio de cultivo pobre en SFB (1%) y se inocularon con 50,000 células en 200 μ L de dicho medio. En la cámara inferior se colocaron 750 μ L de medio de cultivo con 10% de SFB (mismo que funciona como quimioatrayente). Las células se incubaron en condiciones estándar de cultivo durante 24 h y a continuación se procedió a fijar y a teñir los núcleos de las células que invadieron de la siguiente manera: primeramente, los insertos se lavaron con una solución amortiguadora (PBS) y las células se fijaron mediante la inmersión en metanol a -20°C durante 10 min. Luego, los insertos se lavaron con agua bidestilada y los núcleos de las células se tiñeron mediante la inmersión en DAPI a una concentración de 20 mg/mL durante 2 min. Después de la tinción, los insertos se lavaron nuevamente con agua bidestilada y con ayuda de un hisopo se removieron las células en la parte superior de la membrana de polietileno que son aquellas que no fueron capaces de invadir. Los núcleos de las células que invadieron se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia Olympus IX71 (Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular) y se tomaron fotografías para el conteo de células totales, el conteo se realizó en el procesador de imágenes Fiji.

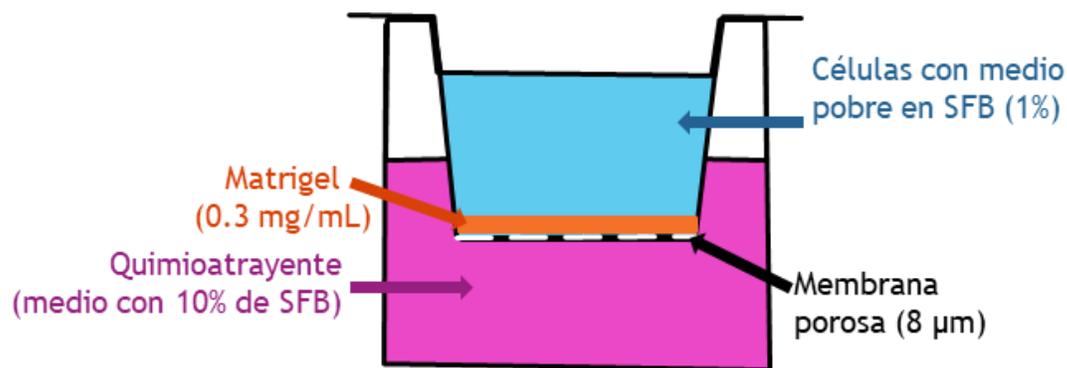


Figura 13. Esquema representativo de las cámaras de Boyden utilizadas en los ensayos de invasión celular. Para evaluar invasión celular se coloca una matriz sobre la membrana porosa que simula la composición de la matriz extracelular, de tal manera que solo las células capaces de degradar la matriz extracelular podrán moverse hacia el quimioatrayente en la parte inferior del pozo.

Análisis y presentación de datos

Todos los resultados se muestran como los promedios de n experimentos independientes \pm el error o la desviación estándar. Las diferencias entre los valores obtenidos para cada ensayo experimental con respecto a la condición control fueron analizados con la prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey o Dunnett para comparar los promedios respecto a la condición control. Los datos fueron analizados con Excel y graficados con el programa GraphPad Prism versión 8.

RESULTADOS

Conteo celular

El conteo en cámaras de Neubauer demostró que las células HEK 293 presentan una mayor densidad celular (células/mL), seguidas por las células C33A, SiHa y HeLa (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados del conteo celular en cámara de Neubauer.

Línea celular	HEK 293	C33A	SiHa	HeLa
Células/mL	2,588,570 ± 80,000	2,084,800 ± 84,000	1,392,000 ± 35,000	880,000 ± 24,000

Estandarización del cultivo de células para la transfección con siRNAs

Los experimentos en los que se cultivaron diferentes cantidades de células de CaCu (SiHa, HeLa y C33A) en cajas de 12 pozos y se cuantificó el RNA obtenido a diferentes tiempos de cultivo, indicaron que la cantidad adecuada de células a cultivar es de 160,000 por pozo (en cajas de 12 pozos), a partir de las cuales se obtuvo en todas las extracciones un aproximado de 6 µg de RNA por pozo.

Evaluación de la eficiencia de la transfección con siRNAs

La eficiencia de la transfección en células SiHa, HeLa y C33A fue evaluada cualitativamente mediante la fluorescencia emitida por el indicador de transfección *siGLO green*. De acuerdo con lo observado, después de las 24 h la eficiencia de la transfección es de más del 90% (Fig. 14). Sin embargo, por lo que visualmente se alcanza a apreciar, las células C33A aparentemente internalizan una menor cantidad de siRNA con respecto a lo que puede observarse en SiHa y HeLa.

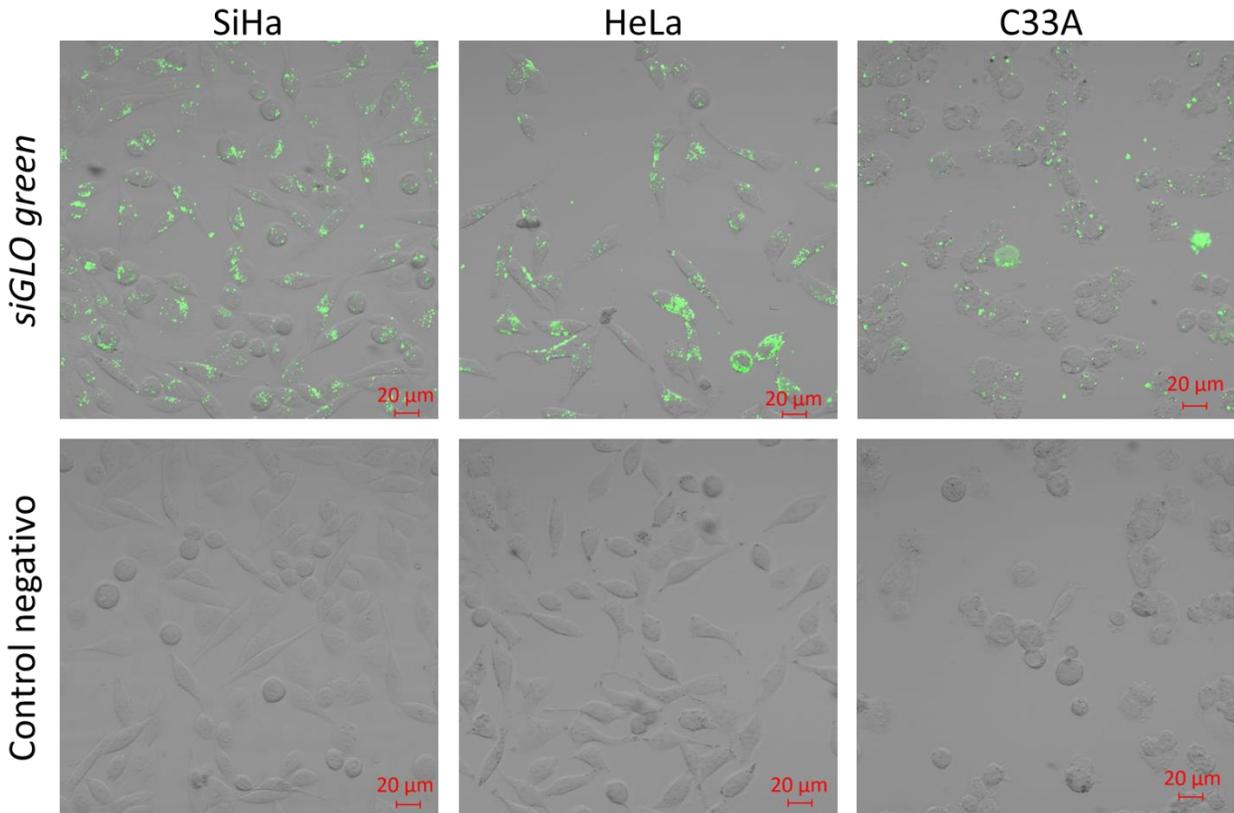


Figura 14. Eficiencia de la transfección en células SiHa, HeLa y C33A. Micrografías que muestran la fluorescencia emitida por los nucleótidos marcados (6-FAM) del indicador de transfección *siGLO green* dentro de las células de CaCu. En la parte inferior se observan los controles negativos los cuales recibieron el mismo tratamiento con el reactivo de transfección, pero sin incluir el indicador fluorescente. En las tres líneas celulares la eficiencia de la transfección es de más del 90%.

Extracción de RNA total

Se estandarizó el protocolo de extracción de RNA total con el reactivo TRIzol. En cuanto al rendimiento, las células de las cuales se puede obtener una mayor cantidad de RNA son las células C33A, seguidas por las células SiHa y HeLa (**Tabla 5**).

El RNA total se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 y se obtuvieron los cocientes 260/280 y 260/230 los cuales indican el grado de pureza del RNA. En todos los casos se empleó RNA que presentó un cociente 260/280 de alrededor de 2.0 (1.9-2.1) y un cociente 260/230 entre 1.8 y 2.2. La pureza y calidad del RNA se corroboró también

mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. En los geles de agarosa se visualizaron las dos bandas características del RNA ribosomal (28S y 18S), además, se puede observar que no hay degradación ni contaminación con DNA (Fig. 15).

Tabla 5. Cantidad de RNA total obtenido de las líneas celulares de CaCu

Línea celular	C33A	SiHa	HeLa
RNA total (µg)	162 ± 4.5	120 ± 16.1	108 ± 0.9

Cultivos en cajas de 100 mm a una confluencia del 90%. Los datos mostrados son el promedio de dos extracciones independientes

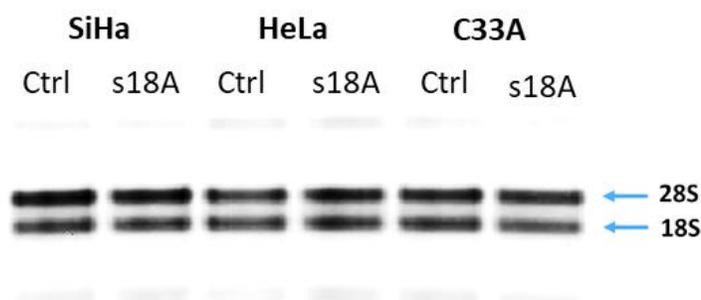


Figura 15. Separación electroforética del RNA total extraído de líneas celulares de CaCu. Imagen representativa de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. La separación electroforética del RNA se realizó a 85 V durante 30 min. En cada carril se colocaron 500 ng de RNA total de células SiHa, HeLa y C33A transfectadas con un siRNA *nonsense* (control, Ctrl) o con un siRNA contra la variante *SCN8A-18A* (s18A). Se observan claramente las dos bandas características del RNA ribosomal esperadas (28S y 18S).

PCR en tiempo real (qPCR)

Rangos dinámicos

Con la finalidad de establecer el intervalo de concentración de cDNA adecuado para la amplificación de la variante adulta del exón 18 del gen *SCN8A* para realizar las qPCRs posteriores, se realizó el ensayo de rangos dinámicos. Una vez que las reacciones de qPCR finalizaron, se realizaron las correcciones a las curvas y se estableció un valor

umbral de la fluorescencia emitida en función del número de ciclos de la reacción. Este valor umbral se fijó en la fase geométrica y, de acuerdo con este, el equipo proporcionó los valores de Ct de los duplicados, el Ct promedio y la desviación estándar. Los valores de Ct obtenidos (Tabla 6) se graficaron con respecto al logaritmo base 10 de la concentración de cDNA, los datos se ajustaron a una recta y se obtuvo la ecuación. A partir de la pendiente se calculó la eficiencia de la amplificación la cual fue del 94.61% (Fig. 16).

Tabla 6. Valores de Ct para cada ensayo en función de la concentración de cDNA empleada.

Dilución	[cDNA] (ng/μl)	Log [cDNA] (ng/μl)	Ct promedio
stock	300	2.47	13.66
1:2	150	2.17	14.69
1:4	75	1.87	15.87
1:8	37.5	1.57	16.86
1:16	18.75	1.27	17.78

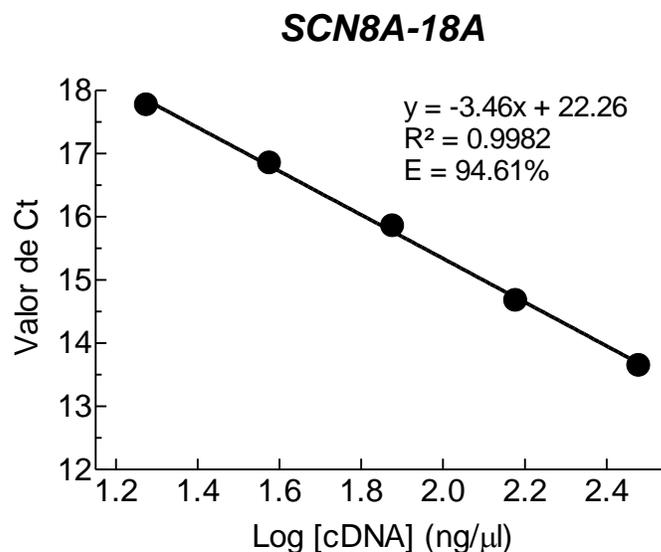


Figura 16. Ajuste al modelo de regresión lineal de los datos obtenidos de los ensayos de rangos dinámicos para la variante adulta del exón 18 del gen *SCN8A*. A partir del valor de la pendiente de la recta se calculó la eficiencia de la amplificación medida con la sonda *TaqMan*® para la variante 18A en el rango de [cDNA] estudiado. En el gráfico se muestra el porcentaje de eficiencia.

Validación de la función de los siRNAs

Para las reacciones de qPCR de los experimentos de silenciamiento con siRNAs, se fijó el valor umbral de fluorescencia como se describió anteriormente (**Fig. 17**) y se obtuvieron los Ct de cada condición por duplicado. Los cambios en los niveles de expresión de la variante 18A, $\Delta 18$ y 18N del gen *SCN8A* fueron cuantificados mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001), para lo cual los valores del gen problema se normalizaron con respecto a la expresión del gen constitutivo *HPRT-1* y se compararon con lo obtenido en la muestra control (con siRNA *nonsense*) en cada línea celular.

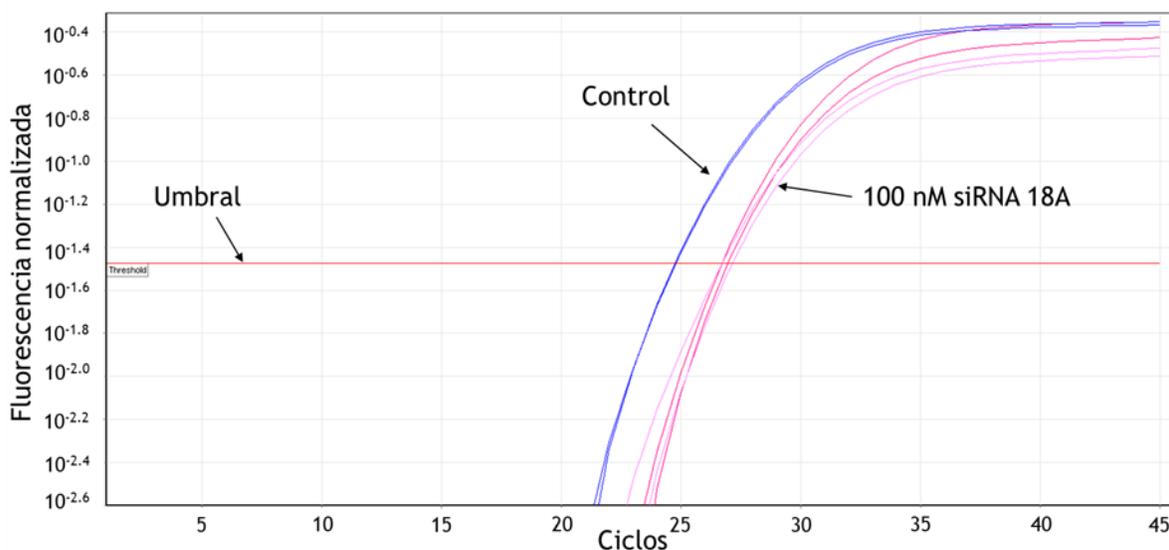


Figura 17. PCR en tiempo real (qPCR) para la variante 18A del gen *SCN8A* en células SiHa. Las líneas continuas de colores representan el aumento de la fluorescencia emitida como consecuencia de la amplificación del cDNA de interés en función del número de ciclos de la reacción. Conforme avanza la reacción, el software acoplado al detector del equipo, calcula el valor específico de emisión de fluorescencia para cada ciclo. Las líneas azules son los duplicados de la condición control (con siRNA *nonsense*) y las líneas rosas son los duplicados con 100 nM de siRNA contra la variante 18A a las 48 y 72 h de la transfección. La línea roja horizontal indica el valor umbral elegido para determinar los valores de Ct de cada reacción.

En la **Tabla 7** se presenta un resumen de los Ct promedio obtenidos en las qPCRs para los ensayos de silenciamiento de la variante 18A en las células HEK-Nav1.6, SiHa, HeLa y C33A. Los valores de Ct son inversamente proporcionales al nivel de expresión de

cada gen (Shipley, 2006); por lo que los valores más bajos de Ct observados en la línea celular HEK-Nav1.6 indica que en estas células la variante adulta del gen *SCN8A* se encuentra en el rango de expresión alta, mientras que las células SiHa y C33A presentan expresión moderada. Por el contrario, las células HeLa presentaron los valores de Ct más altos indicando que estas tienen los niveles más bajos de expresión, tal y como ya se había reportado anteriormente por nuestro grupo de investigación (Delgado-Herrera, 2021). En cuanto a los niveles de expresión del gen *HPRT-1* utilizado como control interno en las cuatro líneas celulares, se encontró que la expresión es alta, siendo en células HEK-Nav1.6 más abundante con Ct de 18 y, por su parte, en células CaCu se mantuvo estable con un Ct alrededor de 22.

En la **Tabla 8** se muestra un resumen de los Ct obtenidos en los ensayos de silenciamiento correspondientes a la variante *SCN8A-Δ18* en las tres líneas celulares de CaCu. En estos ensayos se utilizaron dos siRNAs contra la variante $\Delta 18$ (ver Tabla 3), por separado y en cotransfección utilizando 100 nM de cada uno y, como se puede apreciar en la **Tabla 8**, ambos siRNAs aumentan los valores de Ct en la misma proporción en las tres líneas celulares de CaCu. Nuevamente, las células HeLa presentan los niveles de expresión más bajos de la variante *SCN8A-Δ18*, por lo que en general en estas células hay mucha variación en la medición del valor de Ct. Además, se realizaron ensayos de cotransfección del siRNA contra la variante *SCN8A-18A* y de ambos siRNAs contra *SCN8A-Δ18* con la finalidad de corroborar que la expresión de ambas variantes se reduce.

Tabla 7. Valores de Ct promedio en células transfectadas con siRNAs contra la variante SCN8A-18A.

HEK-Nav1.6								
	Variante SCN8A-18A				HPRT-1			
	Control	50 nM	100 nM		Control	50 nM	100 nM	
24 h	16.7	17.0	17.5		18.8	18.4	19.0	
48 h	15.5	15.8	16.0		18.2	18.1	18.4	
SiHa								
	Variante SCN8A-18A				HPRT-1			
	Control	50 nM	100 nM	150 nM	Control	50 nM	100 nM	150 nM
24 h	26.0	26.2	26.8	27.0	22.3	22.2	22.5	22.7
48 h	25.7	26.3	26.7	27.0	22.3	22.1	22.1	22.8
72 h	24.8	26.1	26.9	26.5	22.1	22.3	22.3	22.6
HeLa								
	Variante SCN8A-18A				HPRT-1			
	Control	50 nM	100 nM	150 nM	Control	50 nM	100 nM	150 nM
24 h	30.2	-	30.0	-	22.1	-	22.7	-
48 h	27.2	-	29.8	-	22.4	-	22.6	-
72 h	28.3	-	28.7	-	23.1	-	23.2	-
C33A								
	Variante SCN8A-18A				HPRT-1			
	Control	50 nM	100 nM	150 nM	Control	50 nM	100 nM	150 nM
24 h	26.4	-	26.9	-	22.4	-	22.5	-
48 h	25.6	-	26.2	-	21.9	-	22.1	-
72 h	25.8	-	26.7	-	22.3	-	22.7	-

Los datos son representativos de cuatro (HEK-Nav1.6 y HeLa) y tres (SiHa y C33A) experimentos e indican el Ct promedio de los duplicados de cada reacción de qPCR. Los controles fueron tratados con un siRNA *nonsense* que no tiene una secuencia de mRNA blanco, mientras que las concentraciones 50, 100 y 150 nM indican la concentración de siRNA contra la variante SCN8A-18A que se utilizó en cada caso. Los guiones (-) indican que esa condición no fue evaluada.

Como puede observarse en la **Tabla 9**, las tres líneas celulares presentan un aumento del Ct para las variantes SCN8A-18A y SCN8A-Δ18 en la condición de cotransfección, mientras que la variante SCN8A-18N, que no debería variar en esta cotransfección, se mantiene constante en efecto en células C33A, no así en células SiHa y HeLa donde se observa mucha variabilidad. Lo anterior puede explicarse en células HeLa porque el

nivel de expresión de *SCN8A-18N* es muy bajo, al igual que la variante *SCN8A-Δ18* (Delgado-Herrera, 2021). Por su parte, en células SiHa a pesar de que vemos un aumento en el Ct, al realizar el análisis comparativo por el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, se obtiene una diferencia que no es tan importante como la encontrada para la variante $\Delta 18$, por lo que es posible que para los ensayos funcionales esta variación no tendrá relevancia. Es importante mencionar que en las Tablas 8 y 9 los valores de Ct del gen *HPRT-1* en HeLa difieren mucho de los presentados en SiHa y C33A, la razón de ello es que en HeLa se utilizó un cDNA cuatro veces más concentrado en esas qPCRs para disminuir la variabilidad asociada a los extremadamente bajos niveles de *SCN8A-Δ18* y *SCN8A-18N*.

Tabla 8. Valores de Ct promedio de células de CaCu transfectadas con siRNAs contra la variante *SCN8A-Δ18*.

SiHa								
	Variante <i>SCN8A- Δ18</i>				<i>HPRT-1</i>			
	Control	$\Delta 18-1$	$\Delta 18-2$	$\Delta 18-1$ y $\Delta 18-2$	Control	$\Delta 18-1$	$\Delta 18-2$	$\Delta 18-1$ y $\Delta 18-2$
24 h	26.8	28.2	27.5	28.3	23.3	23.5	22.9	23.3
48 h	26.8	27.7	27.8	28.6	23.1	23.3	23.5	24.4
HeLa								
	Variante <i>SCN8A- Δ18</i>				<i>HPRT-1</i>			
	Control	$\Delta 18-1$	$\Delta 18-2$	$\Delta 18-1$ y $\Delta 18-2$	Control	$\Delta 18-1$	$\Delta 18-2$	$\Delta 18-1$ y $\Delta 18-2$
24 h	31.8	33.6	33.4	-	20.3	20.5	20.7	-
48 h	32.3	32.6	34.2	-	20.6	20.5	20.4	-
C33A								
	Variante <i>SCN8A- Δ18</i>				<i>HPRT-1</i>			
	Control	$\Delta 18-1$	$\Delta 18-2$	$\Delta 18-1$ y $\Delta 18-2$	Control	$\Delta 18-1$	$\Delta 18-2$	$\Delta 18-1$ y $\Delta 18-2$
24 h	28.6	30.1	29.0	-	23.5	24.0	23.4	-
48 h	27.6	28.1	28.6	-	23.0	23.1	23.6	-

Los datos son representativos de dos experimentos para cada línea celular e indican el Ct promedio de los duplicados de cada reacción de qPCR. Los guiones (-) indican que esa condición no fue evaluada.

Tabla 9. Valores de Ct promedio en células de CaCu cotransfectadas con siRNAs contra las variantes *SCN8A-18A* y *SCN8A-Δ18*.

SiHa								
	Variante <i>SCN8A-18A</i>		Variante <i>SCN8A- Δ18</i>		Variante <i>SCN8A-18N</i>		<i>HPRT-1</i>	
	Control	Cotransfección	Control	Cotransfección	Control	Cotransfección	Control	Cotransfección
24 h	27.2	26.8	28.7	31.1	29.1	30.4	24.9	25.5
48 h	27.2	28.5	27.7	29.8	28.0	29.3	23.5	24.5
HeLa								
	Variante <i>SCN8A-18A</i>		Variante <i>SCN8A- Δ18</i>		Variante <i>SCN8A-18N</i>		<i>HPRT-1</i>	
	Control	Cotransfección	Control	Cotransfección	Control	Cotransfección	Control	Cotransfección
24 h	28.9	29.4	33.4	34.8	34.0	38.1	20.1	22.0
48 h	28.3	28.9	32.4	35.4	35.4	35.1	20.5	20.9
C33A								
	Variante <i>SCN8A-18A</i>		Variante <i>SCN8A- Δ18</i>		Variante <i>SCN8A-18N</i>		<i>HPRT-1</i>	
	Control	Cotransfección	Control	Cotransfección	Control	Cotransfección	Control	Cotransfección
24 h	27.6	27.9	28.3	28.8	28.2	28.1	23.7	23.3
48 h	27.0	27.9	26.8	28.1	27.5	27.9	23.2	23.4

Los datos son representativos de dos experimentos para cada línea celular e indican el Ct promedio de los duplicados de cada reacción de qPCR a las 48 h de la transfección. En la cotransfección se incluyeron tres siRNAs: contra la variante *SCN8A-18A* y los dos contra *SCN8A-Δ18* para lo cual se utilizó 100 nM de cada uno. En este ensayo se cuantificaron las tres variantes de *SCN8A-18* y el gen constitutivo *HPRT-1*.

Con la finalidad de abatir por completo el gen *SCN8A*, se utilizó un siRNA dirigido contra el exón 19 (E19, ver Tabla 3), puesto que este exón se encuentra presente en todas las variantes del gen. Sin embargo, los ensayos realizados con distintas concentraciones (100 y 200 nM) y en cotransfección con el siRNA contra *SCN8A-18A* no mostraron efecto de silenciamiento por parte del siRNA contra E19 y solo se observó el efecto del siRNA contra la variante adulta, por lo que concluimos que el siRNA contra E19 no ejerce un silenciamiento efectivo contra *SCN8A* (Tabla 10).

Tabla 10. Valores de Ct promedio de células SiHa y C33A transfectadas con siRNAs contra E19 y la variante SCN8A-18A por separado y en cotransfección.

SiHa										
	Variante SCN8A-18A					HPRT-1				
	Control	100 nM E19	200 nM E19	100 nM E18A	E19 y E18A (100 nM cada uno)	Control	100 nM E19	200 nM E19	100 nM E18A	E19 y E18A (100 nM cada uno)
24 h	26.6	26.8	27.0	27.3	27.1	23.1	23.1	23.2	23.7	23.0
48 h	26.6	26.8	27.0	27.6	27.3	23.0	23.7	23.3	23.3	23.6

C33A										
	Variante SCN8A-18A					HPRT-1				
	Control	100 nM E19	200 nM E19	100 nM E18A	E19 y E18A (100 nM cada uno)	Control	100 nM E19	200 nM E19	100 nM E18A	E19 y E18A (100 nM cada uno)
24 h	27.7	27.4	28.0	27.8	27.7	24.1	23.6	24.0	23.7	23.9
48 h	27.4	27.8	27.4	27.8	27.8	24.2	24.6	24.4	24.5	24.4

Los datos son representativos de tres experimentos (C33A) y de una observación (SiHa) e indican el Ct promedio de los duplicados de cada reacción de qPCR.

Silenciamiento de las variantes del exón 18 del gen SCN8A

En un primer ensayo de silenciamiento en la línea celular HEK-Nav1.6 que expresa establemente la variante *SCN8A-18A* se obtuvo una reducción de la expresión del 27.68% ± 4.80% con respecto a la condición control a las 48 h de la transfección utilizando 50 nM del siRNA (ANOVA, seguida de Tukey $P < 0.0001$; **Fig. 18**). Asimismo, la reducción en la expresión de *SCN8A-18A* no muestra diferencias entre las dos concentraciones de siRNA evaluadas (50 y 100 nM; **Fig. 18**). Estos datos confirman la expresión estable de Nav1.6 adulta en esta línea celular, pues al comparar los valores de Ct para la expresión de *SCN8A-18A* en HEK-Nav1.6 contra los de SiHa, HeLa y C33A y, si se tiene en cuenta que cada valor de Ct corresponde a una duplicación del cDNA de interés, se observa que en las primeras el gen se expresa cerca de 1,024 veces más que en SiHa y C33A y 16,384 veces más que en HeLa (**Tabla 7**).

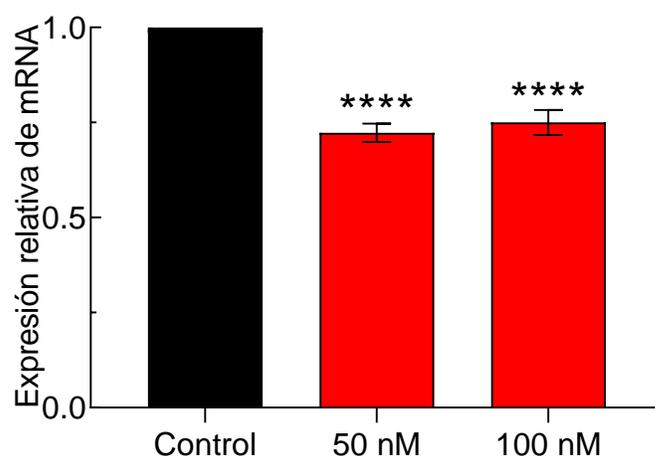


Figura 18. Abatimiento de la expresión de la variante SCN8A-18A en células HEK-Nav1.6. Niveles de expresión relativa del mensajero de la variante SCN8A-18A después de 48 h de la transfección de células HEK-Nav1.6 con 50 y 100 nM de siRNA. Control, células transfectadas con siRNA *nonsense*. Los niveles de expresión relativa del mRNA se calcularon a partir de los valores de Ct para cada condición utilizando el método comparativo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001) y el gen de referencia empleado fue el *HPRT-1*. ****, significancia estadística $P < 0.0001$ con ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey. Las barras representan el error estándar de cuatro observaciones independientes por duplicado.

En cuanto a los ensayos de silenciamiento de la variante SCN8A-18A en células de CaCu, se encontró que en células SiHa hay una reducción en la expresión con las tres concentraciones de siRNA evaluadas (50, 100 y 150 nM) que se mantuvo a las 24, 48 y 72 h después de la transfección. Sin embargo, el análisis estadístico con ANOVA de una vía y con la prueba de Dunnett indicaron que la mejor condición para el silenciamiento se presenta al utilizar 100 nM del siRNA, con esta concentración la expresión se reduce hasta en un $58.38\% \pm 13.42\%$ a las 72 h de la transfección (**Fig. 19**). Derivado de este resultado, para el caso de células HeLa y C33A se evaluó únicamente la condición con 100 nM del siRNA. En células HeLa, de acuerdo con el análisis mediante el método comparativo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ el mayor silenciamiento se consigue a las 48 h con una reducción del $65.29\% \pm 9.79\%$ (ANOVA y Dunnett $P < 0.05$) (**Fig. 20A**); no obstante, nuevamente las mediciones de Ct en células HeLa resultan complicadas por presentar niveles bajos de

las tres variantes del exón 18 del gen *SCN8A*, por lo que en este caso también se observa variabilidad en la expresión relativa. En células C33A se observa una disminución de la expresión del $36.51\% \pm 12.12\%$ a las 24 h de la transfección (**Fig. 20B**), a pesar de que los niveles de mRNA en condición control son muy similares a las células SiHa, en C33A no se consigue un mejor silenciamiento, esto pudiera deberse a lo observado en la evaluación cualitativa de la transfección con reactivo *siGLO green* donde aparentemente C33A internaliza menos siRNA que SiHa y HeLa.

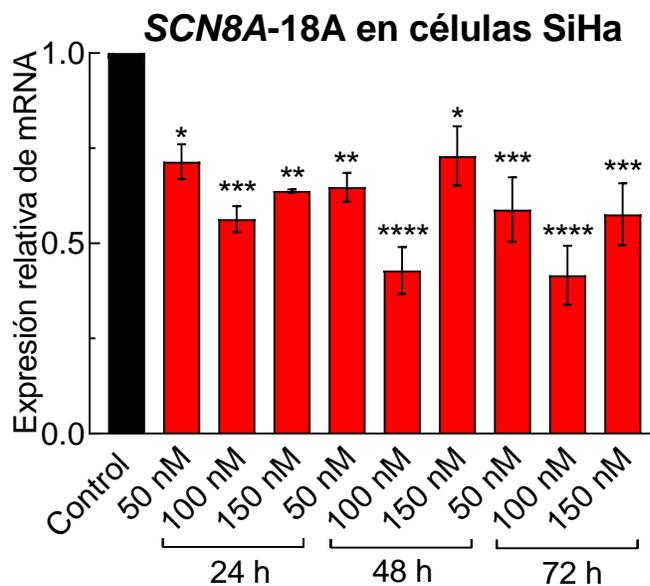


Figura 19. Abatimiento de la expresión de la variante *SCN8A-18A* en células SiHa con un siRNA específico. Niveles de expresión relativa de la variante *SCN8A-18A* en células tratadas con 50, 100 y 150 nM del siRNA en los tres tiempos indicados. Los valores están normalizados respecto al control de cada tiempo (células transfectadas con siRNA *nonsense*), el gen de referencia empleado fue el *HPRT-1*. Significancia estadística obtenida de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett: **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ y * $P < 0.05$. Las barras representan el error estándar de tres observaciones independientes por duplicado.

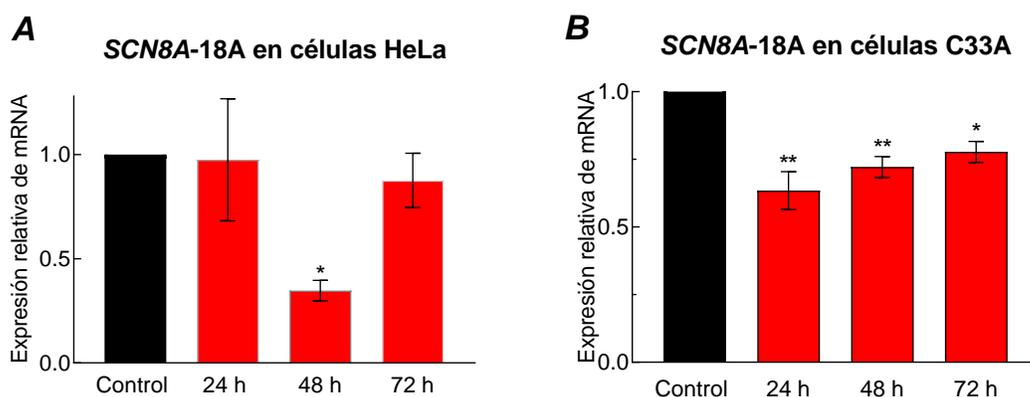


Figura 20. Expresión de la variante *SCN8A-18A* en células HeLa y C33A después del tratamiento con un siRNA específico. Nivel de expresión relativa de la variante *SCN8A-18A* en células HeLa y C33A a las 24, 48 y 72 h después de la transfección con 100 nM de siRNA. Los datos se encuentran normalizados con respecto al control de cada tiempo evaluado y el gen de referencia empleado fue el *HPRT-1*. Significancia estadística obtenida de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett: ** $P < 0.01$ y * $P < 0.05$. Las barras representan el error estándar de cuatro (A) y tres (B) observaciones independientes por duplicado.

El abatimiento de la variante *SCN8A-Δ18* fue evaluado primeramente en células SiHa, ya que estas presentan el nivel de expresión más alto (Delgado-Herrera, 2021). En este caso, se estudió el efecto de dos siRNAs distintos dirigidos contra dicha variante (ver Tabla 3), cada uno por separado y ambos en cotransfección, utilizando en todos los casos 100 nM de cada siRNA. En la **Fig. 21** se muestra el nivel de expresión relativa del mRNA en cada condición a las 24 y 48 h después de la transfección. Como se aprecia, ambos siRNAs son igualmente efectivos en el abatimiento de *SCN8A-Δ18*; además, se observa que la cotransfección de los siRNAs tiende a mejorar el efecto de silenciamiento a las 24 h obteniendo una reducción de la expresión del $60.09\% \pm 3.17\%$. En lo que respecta a las células HeLa y C33A, los niveles relativos muestran mucha variabilidad, lo cual puede deberse a que presentan un nivel bajo de esta variante con respecto a células SiHa. En las células HeLa se observa un mayor efecto de silenciamiento a las 48 h con el siRNA $\Delta 18-2$ con una reducción del $78.49 \pm 2.82\%$ (**Fig. 22A**), mientras que en

C33A el mayor efecto ocurre a las 24 h con el siRNA $\Delta 18-1$, una reducción del $56.95 \pm 7.56\%$ (Fig. 22B). Derivado de estos resultados, se optó por utilizar ambos siRNAs contra *SCN8A- $\Delta 18$* en cotransfección para los experimentos funcionales de proliferación, migración e invasión celular.

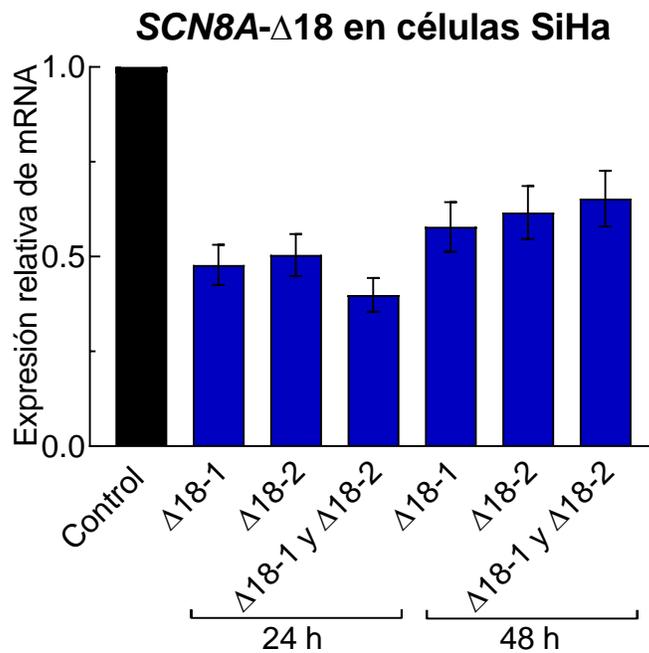


Figura 21. Niveles de expresión de la variante *SCN8A- $\Delta 18$* en células SiHa. Expresión relativa de la variante *SCN8A- $\Delta 18$* en células SiHa a las 24 y 48 h después de la transfección con 100 nM de cada siRNA. El mayor silenciamiento ocurre a las 24 h en la condición de cotransfección con ambos siRNAs contra *SCN8A- $\Delta 18$* con una reducción de alrededor del 60% (nivel de expresión en un rango de 36.7 a 43.0%) con respecto a la condición Control (100%). Los datos se encuentran normalizados con respecto al control de cada tiempo evaluado y el gen de referencia empleado fue el *HPRT-1*. Las barras representan la desviación estándar de los valores de dos observaciones independientes por duplicado.

Además del silenciamiento individual de *SCN8A-18A* o *SCN8A- $\Delta 18$* , también se exploró la posibilidad de que la cotransfección del siRNA contra la variante adulta y ambos siRNAs contra $\Delta 18$ pudieran abatir simultáneamente ambas variantes. Para ello se

realizaron cotransfecciones en las tres líneas celulares y se cuantificó el mRNA de las tres variantes del exón 18 del gen *SCN8A* con respecto a un control con siRNA *nonsense*. En la **Fig. 23** se muestra lo obtenido a las 48 h de la transfección y después de realizar el análisis por el método comparativo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Para empezar, la expresión relativa de la variante *SCN8A-18A* se reduce efectivamente en las tres líneas celulares, aunque con menor eficiencia que cuando se introduce únicamente el siRNA contra dicha variante. Por su parte, el silenciamiento de la variante *SCN8A-Δ18* conserva el mismo nivel de silenciamiento en células SiHa, mientras que en HeLa y C33A es menos efectivo. En consecuencia, los experimentos funcionales se enfocaron a cuantificar únicamente el efecto de las variantes *SCN8A-18A* y *SCN8A-Δ18*.

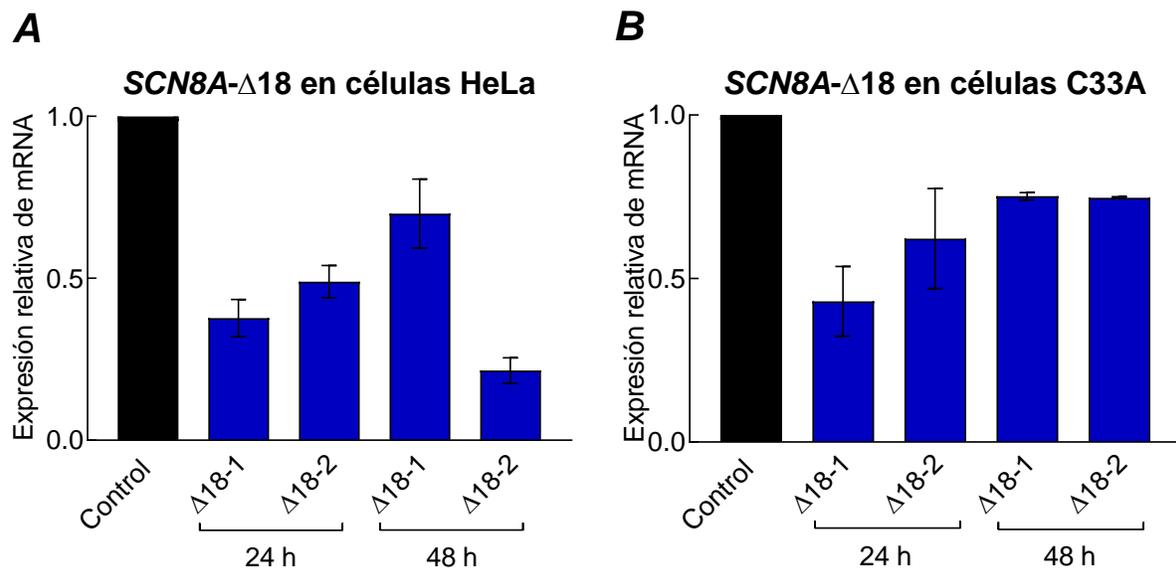


Figura 22. Niveles de expresión de la variante *SCN8A-Δ18* en células HeLa y C33A. Expresión relativa de la variante *SCN8A-Δ18* en las células y tiempos indicados con 100 nM de cada siRNA. En células HeLa (**A**) se observa que el mayor silenciamiento ocurre a las 48 h con el siRNA Δ18-2; por su parte en C33A (**B**) la reducción máxima se observó a las 24 h con el siRNA Δ18-1. Los datos se encuentran normalizados con respecto al control de cada tiempo evaluado y el gen de referencia empleado fue el *HPRT-1*. Las barras representan la desviación estándar de los valores de dos observaciones independientes por duplicado.

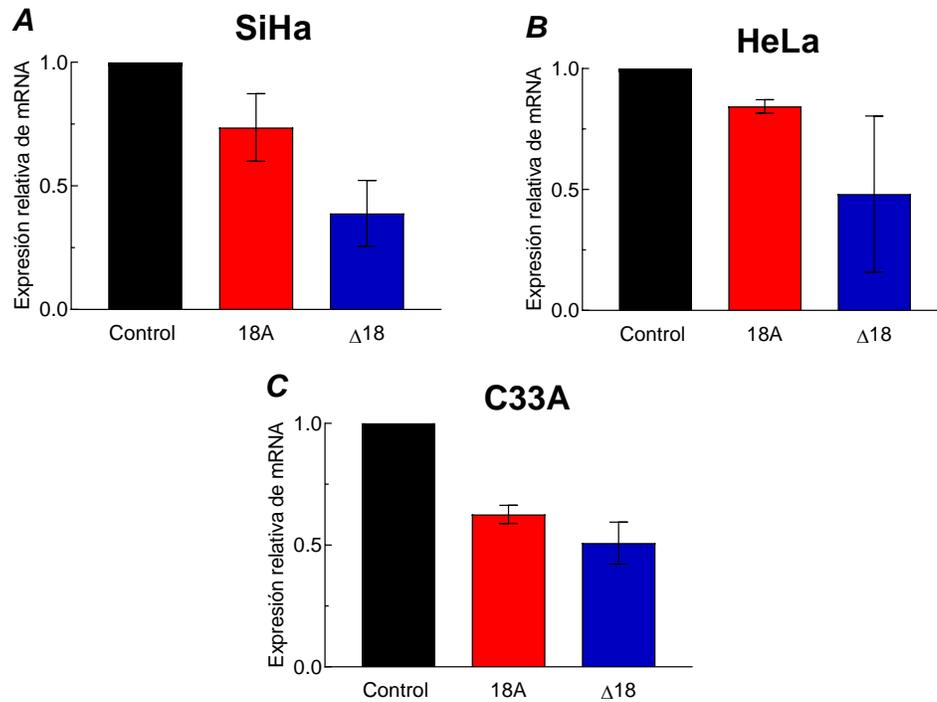


Figura 23. Niveles de expresión de las variantes *SCN8A-18A* y *SCN8A-Δ18* en las líneas celulares de CaCu. Expresión relativa de las variantes a las 48 h de haber realizado la cotransfección de tres siRNAs (contra la variante adulta y ambos siRNAs contra la variante $\Delta 18$) a una concentración de 100 nM cada uno. Se observa que las variantes *SCN8A-18A* y *SCN8A-Δ18* reducen su expresión en las tres líneas celulares. Los datos se encuentran normalizados con respecto al control de las 48 h y el gen de referencia empleado fue el *HPRT-1*. Las barras representan la desviación estándar de los valores de dos observaciones independientes por duplicado.

Adicionalmente, se buscó abatir la expresión por completo del gen *SCN8A* utilizando un siRNA dirigido contra el exón 19 presente en todas las variantes de este gen. Sin embargo, el análisis por el método comparativo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de los datos obtenidos de qPCR mostró que este siRNA no afecta la expresión de la variante *SCN8A-18A*. En la **Fig. 24** se muestra que solo la condición con siRNA contra *SCN8A-18A* presenta efecto de silenciamiento génico, el cual es de $42.57 \pm 8.47\%$ en células C33A y de $36.01 \pm 1.99\%$ en SiHa. El siRNA contra el exón 19 no muestra un efecto positivo para los fines de este proyecto donde se busca reducir la expresión de las variantes *SCN8A-18* para evaluar su efecto en ensayos funcionales de proliferación, migración e invasión celular.

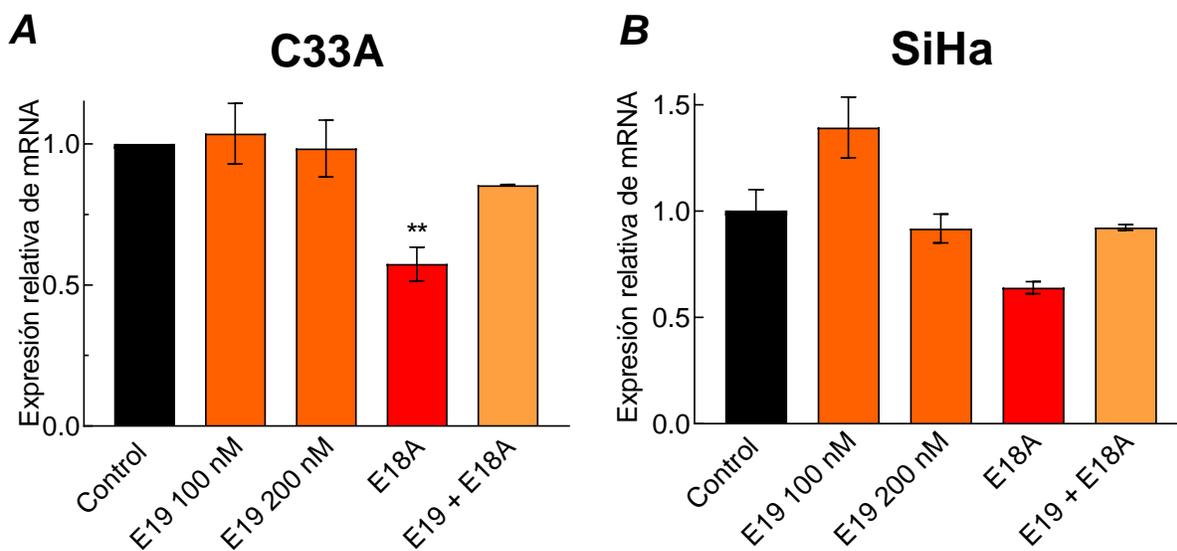


Figura 24. Niveles de expresión de la variante SCN8A-18A en células C33A y SiHa transfectadas con siRNA contra el exón 19 de SCN8A. Se evaluó el efecto de 100 y 200 nM del siRNA E19, y en cotransfección con el siRNA contra la variante 18A, además, como referencia se evaluó nuevamente la condición con el siRNA para la variante 18A. Nótese que solo hubo silenciamiento en la condición con siRNA contra SCN8A-18A. Los datos se encuentran normalizados con respecto a la condición control y el gen de referencia empleado fue el *HPRT-1*. Los datos para C33A (A) representan el promedio de tres observaciones independientes por duplicado y las barras indican el error estándar. En SiHa (B) se muestran los datos de una observación por duplicado y las barras indican la desviación estándar de estos valores. Significancia estadística obtenida de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett: ** $P < 0.01$.

Ensayos de Proliferación

Como parte de la estandarización de los ensayos de proliferación celular, primeramente, se evaluó el crecimiento celular durante cuatro días partiendo de una cantidad inicial de 5,000 células (tiempo 0). La cuantificación del número de células se realizó mediante el método de azul de tripano y el de MTT (absorbancia a 562 nm) en células SiHa y C33A (Fig. 25). Los resultados muestran que tanto SiHa como C33A se duplican aproximadamente cada 24 horas. Asimismo, iniciar con 5,000 células permite medir la absorbancia dentro del rango confiable del espectrofotómetro sin tener que hacer diluciones de las muestras.

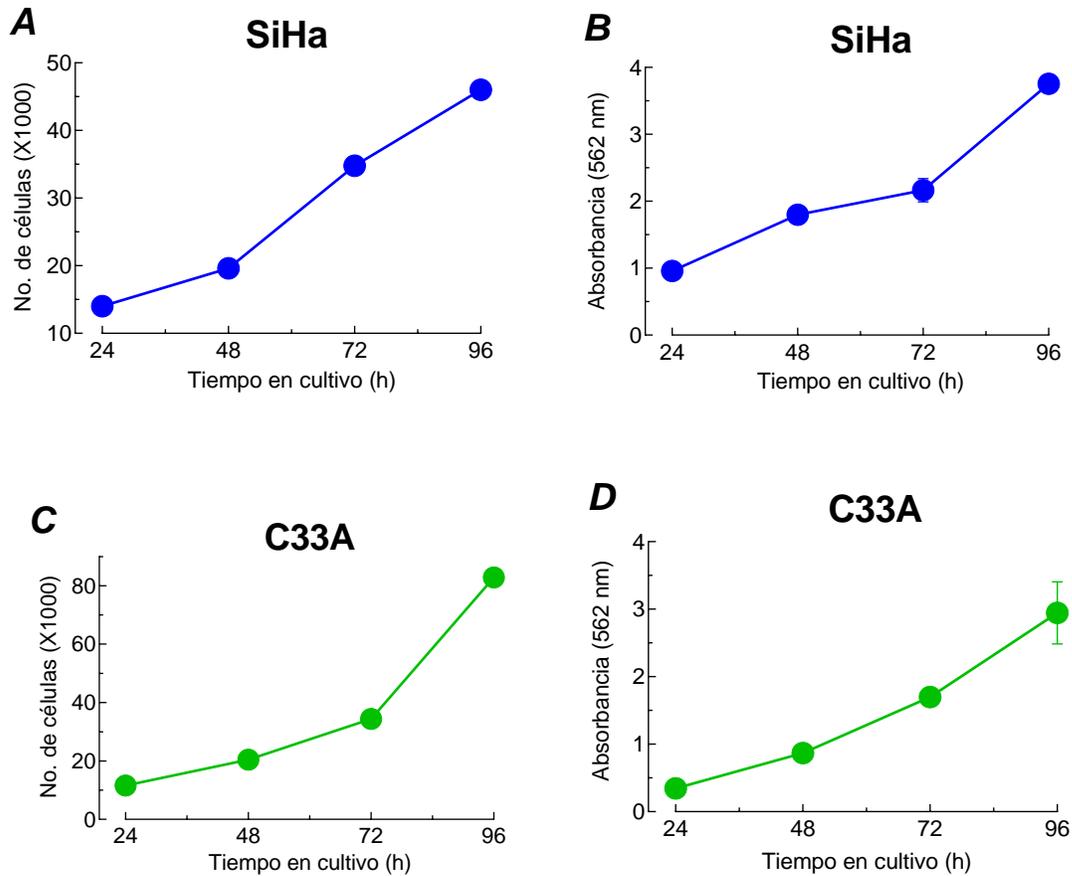


Figura 25. Curvas de proliferación celular basal en células SiHa y C33A. Datos de proliferación celular evaluada por el número de células (A y C en SiHa y C33A, respectivamente) y por la absorbancia a 562 nm debido a la reducción de MTT (B y D en SiHa y C33A, respectivamente) durante 96 h. El número inicial de células (tiempo 0) sembradas fue de 5,000 en cada condición. Los datos de número de células corresponden a una sola observación y los de absorbancia son duplicados de un mismo experimento, las barras representan la desviación estándar de los valores de absorbancia.

Una vez estandarizado el protocolo, se realizaron ensayos de proliferación en SiHa (Fig. 26A), HeLa (Fig. 26B) y C33A (Fig. 26C) en las cuatro condiciones descritas en la metodología. En las tres líneas celulares es claro que las tres condiciones de silenciamiento reducen la proliferación, aunque la variante *SCN8A-18A* parece tener un efecto más robusto. Además, es importante mencionar que en las células HeLa la curva que corresponde al silenciamiento con esta variante, presenta valores de absorbancia

por debajo del valor inicial a partir de las 48 h de iniciado el cultivo celular. Lo anterior sugiere que la variante *SCN8A-18A* no solo reduce la proliferación, sino que la viabilidad celular disminuye respecto al tiempo inicial. En células SiHa la proliferación se reduce desde las 48 h en un $52 \pm 0.9\%$ con el tratamiento contra la variante *SCN8A-18A* y en un $35 \pm 2.4\%$ y $31 \pm 2.7\%$ con el tratamiento contra la variante *SCN8A-Δ18* y la combinación de ambos tratamientos, respectivamente (ANOVA y Dunnett, $P < 0.01$ y $P < 0.05$). Esta reducción en el porcentaje de proliferación se mantiene hasta las 72 h postransfección donde se observa una reducción del $81 \pm 0.7\%$ (ANOVA y Dunnett, $P < 0.001$) con el tratamiento con siRNA contra la variante *SCN8A-18A* y con el tratamiento contra *SCN8A-Δ18* y la combinación de ambos se reduce en un $58 \pm 5.3\%$ y $55 \pm 2.5\%$, respectivamente (ANOVA y Dunnett, $P < 0.01$); en células C33A el efecto también se observa desde las 48 h y es significativo a las 72 h postransfección con una reducción del $73 \pm 4\%$, $76 \pm 1.4\%$ y $63 \pm 12.7\%$ con los tratamientos con siRNA contra *SCN8A-18A*, *SCN8A-Δ18* y contra ambos, respectivamente (ANOVA y Dunnett, $P < 0.01$ y $P < 0.05$). En cuanto a las células HeLa, el efecto es notorio desde las 48 h, sin embargo, el efecto es significativo y mucho más robusto a las 72 h postransfección con el tratamiento con siRNA contra la variante *SCN8A-18A*, con una reducción del $77 \pm 4.3\%$ (ANOVA y Dunnett, $P < 0.05$). Los tratamientos con siRNAs contra la variante *SCN8A-Δ18* y contra ambas variantes también tienden a promover una reducción a las 72 h en células HeLa.

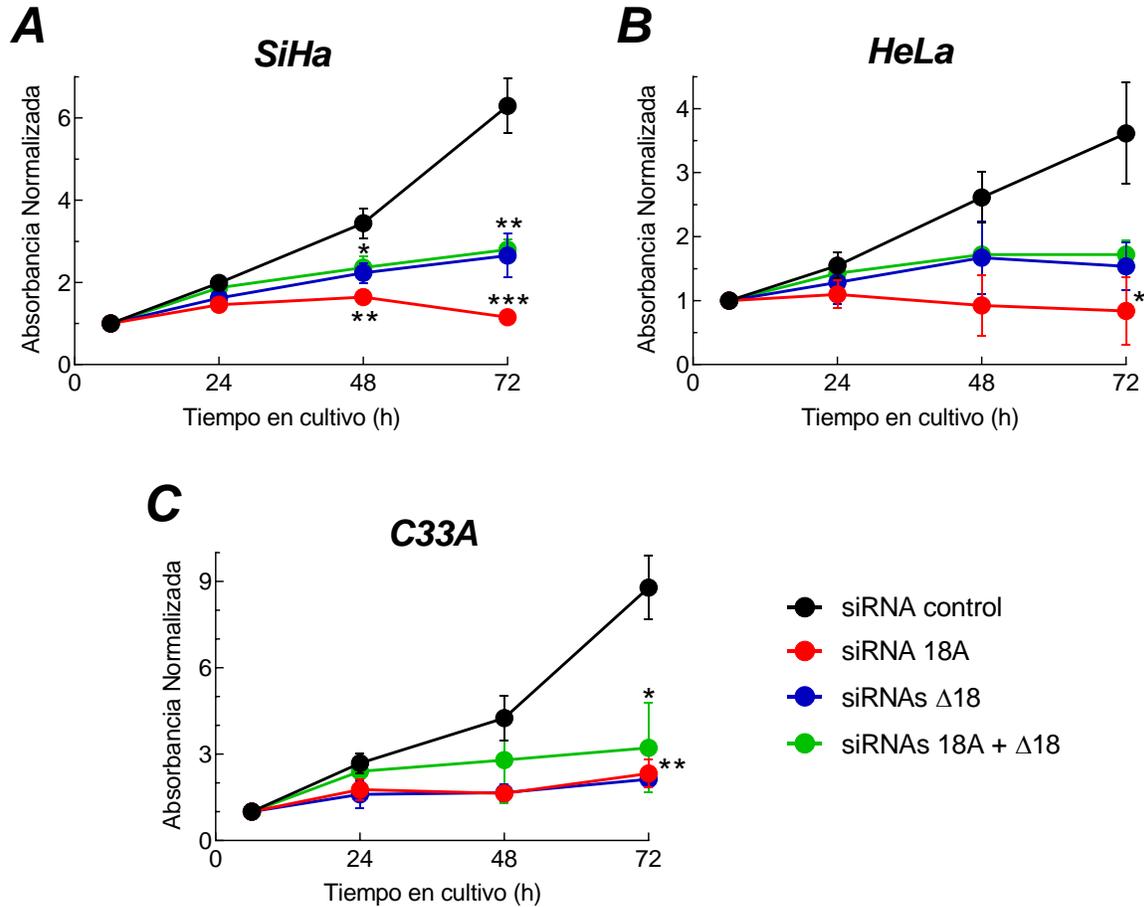


Figura 26. Efecto del silenciamiento de las variantes del gen *SCN8A* en la proliferación celular en células SiHa, HeLa y C33A. En las tres líneas celulares de CaCu la proliferación disminuye en las condiciones de silenciamiento, pero el efecto es más evidente cuando se utiliza solo el siRNA contra la variante 18A. Nótese que en las células HeLa la viabilidad celular disminuye respecto al tiempo inicial con el silenciamiento de la variante 18A. Los datos son los promedios de tres experimentos independientes por duplicado. Estos datos se encuentran normalizados respecto a la absorbancia (562 nm) en el tiempo 6 h de cada condición y las barras representan el error estándar. Los puntos experimentales se compararon con su respectivo control mediante la prueba estadística ANOVA y Dunnett. Significancia estadística: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

Ensayos de Migración

Como parte del estudio del papel de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A* en las propiedades metastásicas de líneas celulares de CaCu, se realizaron ensayos de migración celular en células SiHa, HeLa y C33A mediante el experimento de cierre de

“herida”. En la **Fig. 27** se muestran fotografías representativas de un experimento de migración de células SiHa a las 0 y 72 h de realizada la “herida”. Se presentan todas las condiciones de silenciamiento estudiadas, así como un Control positivo en el cual las células se transfectaron con siRNA *nonsense*, y además no recibieron tratamiento con mitomicina C y se mantuvieron en medio CaCu completo (10% SFB, a diferencia del resto de las condiciones experimentales que fueron incubadas en presencia de 5% de SFB). Esta última condición experimental se utilizó como prueba de concepto y demostrar que la “herida” puede ser repoblada por la migración celular, tal y como se puede constatar en las fotografías correspondientes (Control +). El análisis de fotografías como las mostradas en la Fig. 27 se presentan de manera resumida en la **Fig. 28**. Para cada condición experimental se muestra el porcentaje de migración celular, el cual es inversamente proporcional al área de la “herida”, es decir, un alto porcentaje de migración disminuirá proporcionalmente el área de la “herida”. El área de la “herida” en cada condición se normalizó respecto a la misma al tiempo 0 y en cada panel se muestra el tiempo al cual se observan diferencias en la migración entre los tratamientos.

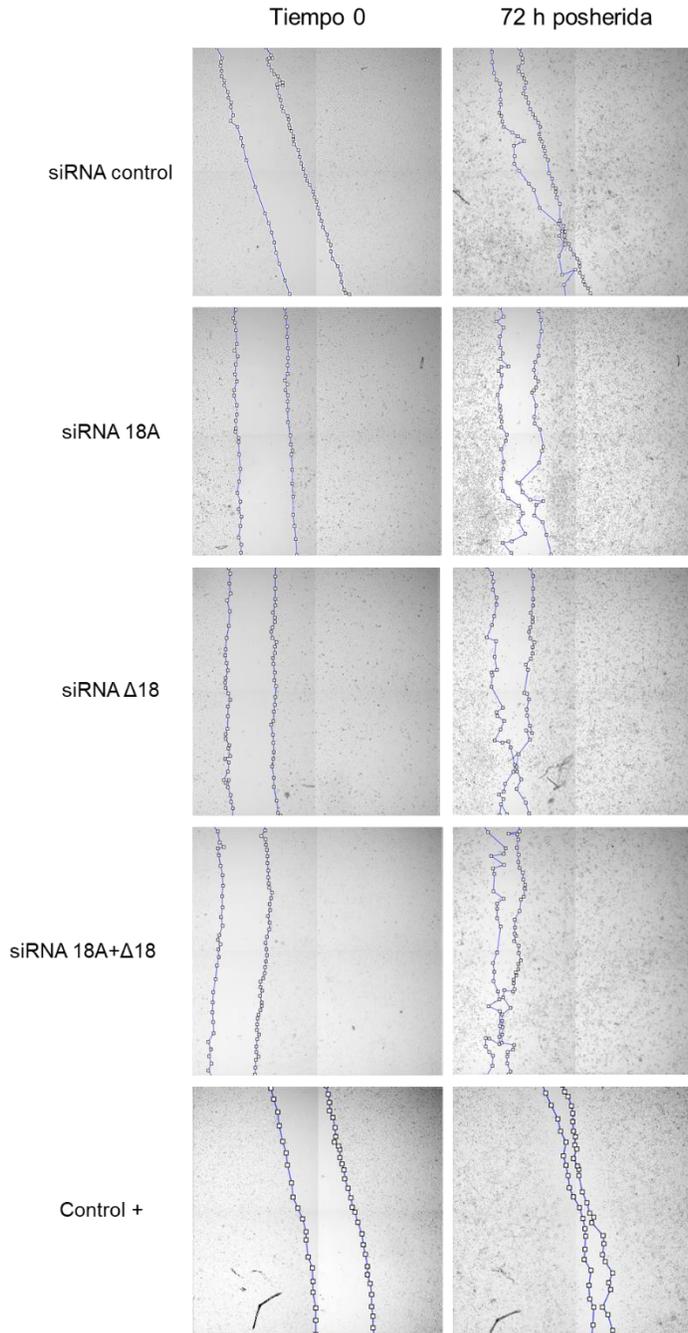


Figura 27. Experimento de cierre de “herida” en células SiHa. Se muestran imágenes representativas a las 0 y 72 h de realizada la “herida” para cada tratamiento. Cada imagen es el ensamble de cuatro imágenes tomadas con objetivo 10X en un microscopio automatizado ImageXpress (Laboratorio Nacional de Canalopatías). El ensamble de las imágenes se realizó en el programa Fiji y con la herramienta de polígono se delimitó el área libre de células, la cual se calculó en unidades arbitrarias dentro del mismo software. Nótese que en el control positivo el cierre de la “herida” es mayor debido a que están involucrados los procesos de migración y proliferación celular.

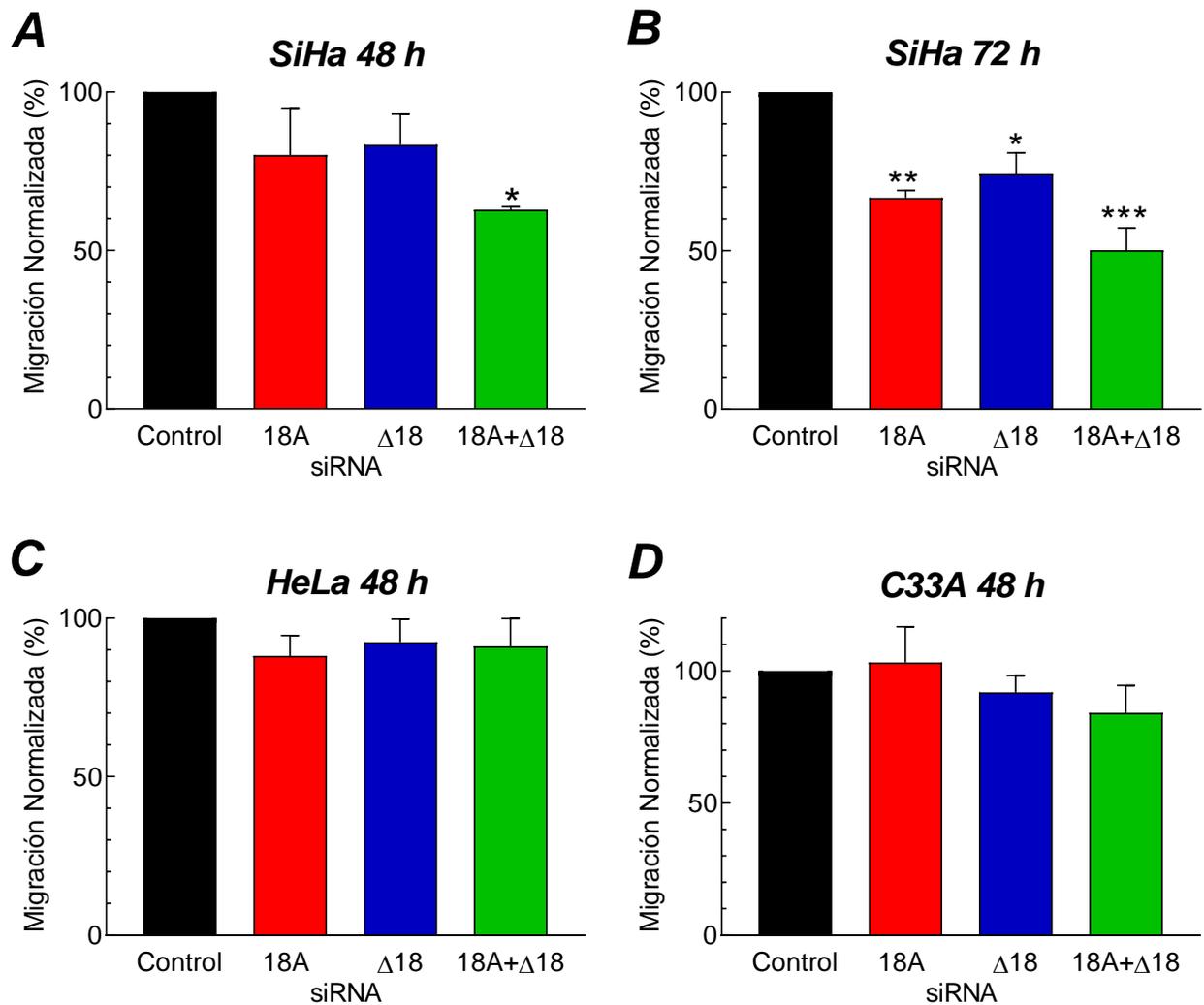


Figura 28. Migración de células de CaCu en condiciones de silenciamiento con siRNAs. Porcentaje de migración celular estimado a partir de la reducción del área de la “herida” a las 72 h de iniciado el experimento. Los datos se normalizaron respecto al porcentaje de migración de la condición Control en la que las células fueron transfectadas con el siRNA *nonsense*. Los datos son el promedio \pm el error estándar de tres experimentos independientes. En las células SiHa se observa un efecto a partir de las 48 h que es más robusto a las 72 h post herida. En células HeLa y C33A no se observaron diferencias entre los tratamientos. ANOVA y Dunnett, significancia estadística: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$.

En general, los datos de la **Fig. 28** muestran una tendencia a la reducción de la migración en las células SiHa como consecuencia del silenciamiento con los diferentes siRNAs. A las 48 h posteriores a la herida, la migración se reduce en un $37 \pm 0.8\%$ con el tratamiento contra las variantes *SCN8A-18A* + *SCN8A-Δ18* (ANOVA y Dunnett, $P < 0.05$), mientras que 72 h después de la herida este efecto es más evidente y se observa un efecto aditivo, pues con el tratamiento contra *SCN8A-18A* la migración se reduce en un $33 \pm 2.2\%$, contra *SCN8A-Δ18* en un $26 \pm 6.6\%$ y la combinación de ambos tratamientos muestra una reducción del $50 \pm 7\%$ (ANOVA y Dunnett, $P < 0.01$, $P < 0.05$ y $P < 0.001$, respectivamente). En contraste, en las células HeLa y C33A no se encontró efecto sobre la migración celular en las diferentes condiciones experimentales (ANOVA y Dunnett, $P > 0.05$).

Ensayos de Invasión

Un fenómeno crucial para el fenotipo metastásico de las células cancerosas es la capacidad de invadir hacia otros tejidos. Para que esto ocurra es necesario que las células sean capaces de degradar la matriz extracelular para así abrirse paso y moverse hacia otros sitios. Con el propósito de estudiar este fenómeno y su posible modulación por las variantes del exón 18 del gen *SCN8A*, se realizaron experimentos funcionales de invasividad utilizando la cámara de Boyden (ver Metodología). En primer lugar, se estandarizó la concentración de Matrigel™ adecuada para preparar los insertos en los que se siembran las células. Se estudiaron tres concentraciones: 0.3, 0.8 y 1.2 mg/mL en un solo experimento por duplicado donde se cultivaron 80,000 células SiHa por inserto y se cuantificó el número de células que lograron degradar la capa de Matrigel™ del fondo del inserto y atravesar al otro lado de dicha matriz. El experimento se llevó a cabo durante 48 h, al término de dicho periodo las células se fijaron, se tiñeron con DAPI y se adquirieron imágenes con microscopía de epifluorescencia. Los resultados mostraron que la concentración de 0.3 mg/mL es la adecuada para estos ensayos ya que permite

una invasión homogénea en toda el área del inserto; por el contrario, con concentraciones mayores (0.8 y 1.2 mg/mL) la invasión es heterogénea y se observa la formación de esferoides, por lo que fueron descartadas (**Fig. 29**). Estos experimentos también permitieron concluir que los ensayos podían realizarse con un menor número de células y un tiempo de incubación más corto para reducir el número de células que logran invadir y facilitar el conteo de las mismas.

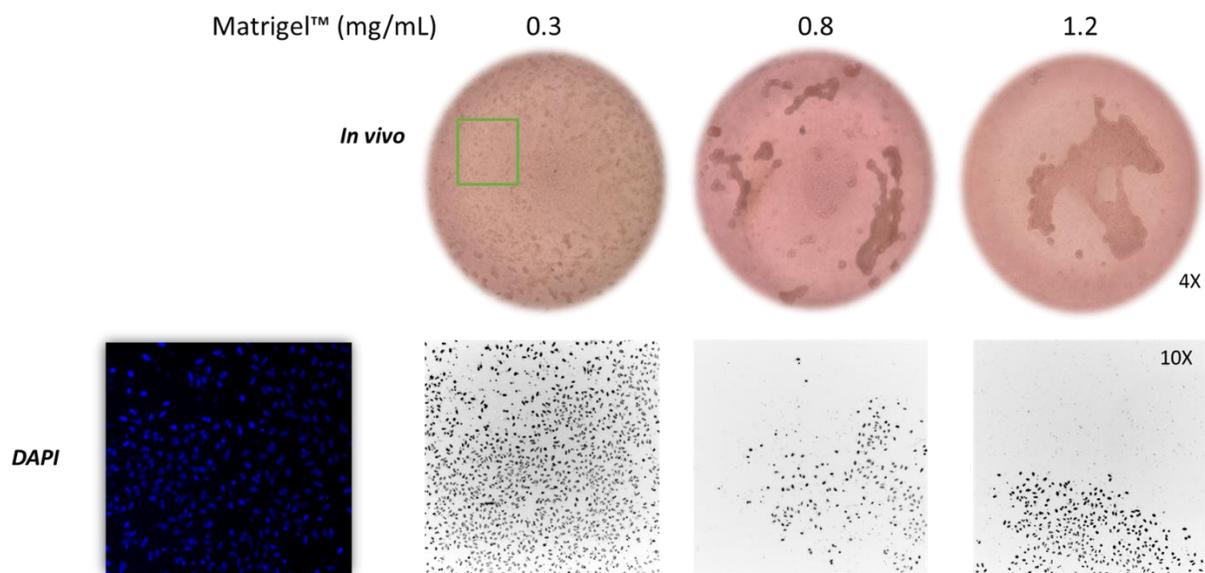


Figura 29. Estandarización del protocolo de invasividad celular. En la parte superior se muestran fotografías de todo el inserto en campo claro (4X). Se observa la presencia de células cuasi homogéneamente distribuidas sobre el Matrigel™ a una concentración de 0.3 mg/mL, sin embargo, nótese la formación de colonias con concentraciones de 0.8 y 1.2 mg/mL. En la parte inferior se muestran imágenes representativas de cada condición después de haber fijado y teñido con DAPI a las células que invadieron (10X). Las células fijadas en la condición con 0.3 mg/mL de Matrigel™ se muestran con los núcleos azules (fotografía extrema izquierda, epifluorescencia) y con la imagen invertida para una mejor visualización. Como se puede apreciar, la condición con 0.3 mg/mL de Matrigel™ permite una invasividad más homogénea.

La capacidad invasiva de las líneas celulares de CaCu en condiciones basales y al disminuir la expresión de las variantes *SCN8A-18* fue evaluada mediante el conteo manual de los núcleos celulares teñidos con DAPI después de 24 h de incubación en las

cámaras de Boyden. Aquí es importante mencionar que las células fueron transfectadas 24 h antes de ser sembradas en los insertos, por lo que el efecto de los siRNAs sobre la capacidad invasiva de las células se cuantificó a las 48 h propiamente. En la **Tabla 11** se muestra el número de células totales que invadieron por cada condición y en cada línea celular. En consistencia con lo reportado en la literatura, las células HeLa (positivas a VPH-18) son más invasivas con respecto a SiHa (positivas a VPH-16) y C33A (sin VPH).

Tabla 11. Número total de células de CaCu que mostraron capacidad invasiva en ensayos de la cámara de Boyden

	siRNA control	siRNA 18A	siRNA Δ18	siRNA 18A + Δ18
		SiHa		
Experimento 1	412-753	215-334	433-434	329-464
Experimento 2	431-678	278-335	367-450	73-161
Experimento 3	734-857	220-494	192-213	396-669
		HeLa		
Experimento 1	2343-2968	2341-2447	1606-2240	1629-2160
Experimento 2	4176-4656	4756-5571	2514-3194	3799-3979
Experimento 3	4798-6372	3325-4098	4337-4398	3607-3700
		C33A		
Experimento 1	399-432	300-388	275-500	89-351
Experimento 2	166-181	137-141	114-123	68-79
Experimento 3	169-186	76-104	217-321	107-117

Valores totales de cada duplicado para cada condición de tres experimentos independientes. Los valores de los duplicados de cada experimento independiente se expresan como rangos.

En la **Fig. 30** se muestra el resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de invasividad de las células de CaCu transfectadas con los diferentes siRNAs contra las variantes del exón 18 del gen *SCN8A*. En general, se observa una tendencia a la reducción del porcentaje de invasión con respecto a la condición con el siRNA *nonsense*, aunque también se observan efectos diferenciales de las variantes del exón 18. Respecto

a la variante adulta (*SCN8A-18A*), esta tiene una mayor contribución en células SiHa (positivas a VPH-16) donde la invasión se reduce en un $51 \pm 3.1\%$ (**Fig. 30A**; ANOVA y Dunnett, $P < 0.05$). Por su parte, la capacidad invasiva de las células HeLa y C33A también mostró una tendencia a la disminución, sin embargo, en estos casos las diferencias no fueron significativas. En lo que se refiere a la variante *SCN8A-Δ18*, esta indujo una disminución de la invasividad de aproximadamente 42% en células SiHa y de 28% en las células HeLa (**Fig. 30A**; positivas a VPH-18). Sin embargo, la dispersión estadística de estos valores promedio es muy alta con una significancia estadística mayor a 0.05, por lo que dicha disminución no es significativa. El caso contrario se observó en las células C33A donde el efecto de la variante *SCN8A-Δ18* fue el mismo que la del siRNA control (*nonsense*; Fig. 30C). Por otro lado, cuando se cotransfectaron los siRNAs contra las variantes *SCN8A-18A* y *SCN8A-Δ18* en las células SiHa se obtuvo el mismo efecto que al abatir únicamente la variante adulta (**Fig. 30A**), lo que indica que la variante $\Delta 18$ no contribuye a la invasividad de las células SiHa. El efecto opuesto se observó en las células HeLa (**Fig. 30B**), en las que el abatimiento de ambas subunidades con los siRNAs respectivos no aumentó el efecto inhibitorio observado únicamente con la variante $\Delta 18$, sugiriendo que en estas células la variante $\Delta 18$ es la principal responsable de la capacidad invasiva asociada a las variantes del exón 18 del gen *SCN8A*. Por último, en las células C33A (negativas a VPH) se requirió de dicha cotransfección para observar una reducción significativa de su capacidad invasiva (**Fig. 30C**), y considerando el efecto nulo de la variante $\Delta 18$ cuando se transfectó únicamente el siRNA contra ésta. Es válido sugerir que el efecto observado en la cotransfección se debió principalmente a la acción de la variante 18A.

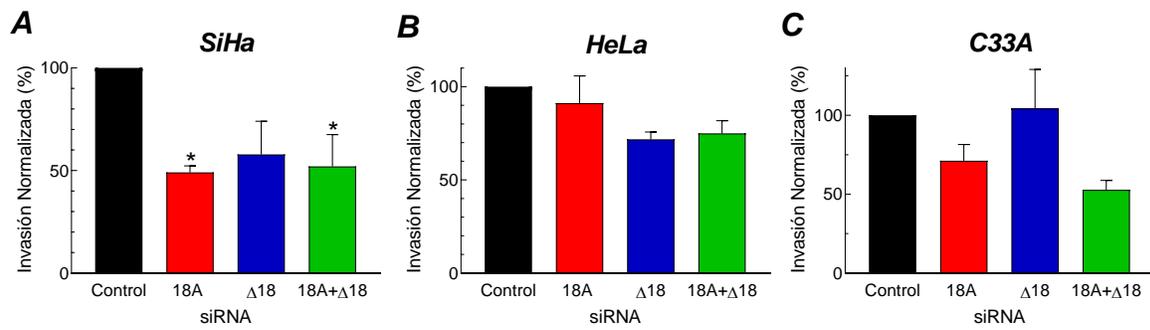


Figura 30. Efecto del silenciamiento de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A* en la capacidad invasiva de las células de CaCu. Los valores se obtuvieron después de incubar las células durante 24 h en cámaras de Boyden y 48 h después de la transfección. Los datos son los promedios de tres experimentos independientes por duplicado y las barras representan el error estándar. * ANOVA seguido de Dunnett: $P < 0.05$.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se utilizaron tres líneas celulares de CaCu que se diferencian por el tejido del cual derivan y por el VPH al cual son positivas (**Tabla 1**). Las células SiHa contienen DNA del VPH-16 que es el más abundante en las biopsias de CaCu (60%), mientras que las células HeLa son positivas al VPH-18 que representa el 15% de los casos de CaCu (Schiffman *et al.*, 2016) y, finalmente, las células C33A son negativas a este virus.

En un trabajo previo de nuestro grupo de investigación se cuantificaron las tres variantes del exón 18 del gen *SCN8A* en estas mismas líneas celulares y, curiosamente, se encontró que las células HeLa presentaban los niveles más bajos de estas variantes (Delgado-Herrera, 2021), pero a su vez son las células con el fenotipo metastásico más agresivo (Sanchez-Sandoval y Gomora, 2019). El interés por estas variantes del canal Nav1.6 surge por los antecedentes de los estudios realizados en nuestro laboratorio donde se encontró que este canal se expresa alrededor de 40 veces más en cultivos primarios de CaCu respecto al tejido cervical no canceroso (Hernandez-Plata *et al.*, 2012), pero que inesperadamente las líneas celulares de CaCu no presentaron corrientes de sodio activadas por voltaje en la membrana plasmática como aquellas observadas en cultivos primarios (Lopez-Charcas *et al.*, 2018). Por otra parte, otro grupo de investigación reportó la localización en vesículas intracelulares y el papel de la variante *SCN8A-Δ18* en la formación de invadopodios en células de melanoma (Carrithers *et al.*, 2009). Estos resultados plantean la posibilidad de que la variante *SCN8A-Δ18* pudiera ejercer su función pro-invasiva en las células de CaCu que no presentan evidencias de la actividad de canales Nav1.6 (*SCN8A-18A*) en su membrana plasmática.

El papel individual de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A* en las propiedades metastásicas de líneas celulares de CaCu no había sido estudiado, por lo que se planteó como objetivo principal de este trabajo. Mediante el empleo de siRNAs específicos para

las variantes *SCN8A-18A* y *SCN8A-Δ18* se buscó disminuir los niveles de expresión al máximo para poder estudiar cómo se modificaban las propiedades de proliferación, migración e invasión celular de acuerdo con el nivel de expresión de dichas variantes. El silenciamiento de las variantes se evaluó cuantitativamente por medio de qPCR y se obtuvieron resultados positivos, aunque en diferente medida según la línea celular. En las tres líneas celulares el nivel de expresión de la variante *SCN8A-18A* se reduce considerablemente a las 48 h postransfección, siendo más evidente en HeLa, seguido de SiHa y, finalmente, en C33A (**Figs. 19 y 20**). En cuanto a la variante *SCN8A-Δ18*, el silenciamiento en las tres líneas celulares ocurre desde las 24 h postransfección (**Figs. 21 y 22**), lo cual podría explicarse porque los niveles de esta variante son más bajos que los de la variante *SCN8A-18A* en las tres líneas celulares (**Tablas 7 y 8**). Por otra parte, la cotransfección de los siRNAs para abatir de manera simultánea ambas variantes se exploró a las 48 h postransfección y se corroboró el silenciamiento, aunque este aparentemente fue menos efectivo que en las transfecciones individuales (**Fig. 23**).

La relevancia funcional del silenciamiento conseguido de estas variantes del exón 18 del gen *SCN8A* se exploró mediante ensayos *in vitro* y los resultados obtenidos se discuten en los párrafos siguientes.

Ensayos de Proliferación

La proliferación sostenida es una característica de las células cancerosas, y forma parte de los llamados *hallmarks* del cáncer: mantenimiento de la señalización de proliferación, evasión de supresores de crecimiento, permisión de la inmortalidad replicativa mediante la recuperación de telómeros y la evasión de la apoptosis, entre otros (Hanahan y Weinberg, 2016).

Los resultados de los experimentos de proliferación del presente trabajo muestran una importante contribución de las variantes *SCN8A-18A* y *SCN8A-Δ18* a este fenómeno,

pues al disminuir sus niveles de expresión mediante la transfección de siRNAs específicos y la cotransfección de ellos, la proliferación se ve considerablemente disminuida a partir de las 48 h postransfección. Aparentemente, la variante *SCN8A-18A* tiende a tener un efecto más robusto, pero la diferencia con el efecto de silenciar la variante *SCN8A-Δ18* no es significativa. Esta es la primera vez que se reporta al canal Nav1.6 asociado a la proliferación en células de CaCu. Estos hallazgos coinciden con los reportados recientemente en cáncer folicular de tiroides donde también realizan ensayos de silenciamiento del canal Nav1.6 con siRNAs y encuentran que la proliferación celular se reduce significativamente (alrededor del 40%, Li *et al.*, 2022), aunque no en un porcentaje tan alto como lo descrito para el silenciamiento de la variante *SCN8A-18A* en células CaCu en este trabajo (reducción entre el 70 y 80%, **Fig. 26**). Anteriormente, en nuestro grupo de investigación se estudió el papel de las subunidades β de los canales Nav en el comportamiento metastásico de líneas celulares de CaCu. En dicho trabajo se reportó un efecto de la subunidad Nav β 1 sobre la proliferación celular específicamente en células SiHa (VPH-16), donde al aumentar su expresión la proliferación se incrementó en un 40% y al abatirla, con el empleo de un siRNA específico, la proliferación se redujo en la misma magnitud a las 96 h postransfección, lo cual fue corroborado con ensayos de ciclo celular mediante citometría de flujo (Sanchez-Sandoval y Gomora, 2019).

De manera interesante, en el presente trabajo se encontró que en células HeLa hay un declive en la curva de la condición tratada con siRNA contra la variante *SCN8A-18A*, lo que indica que la cantidad de células no solo no aumenta con el tiempo, sino que disminuye debido a muerte celular. Esto sugiere que probablemente la evasión de la apoptosis es el mecanismo por el cual el canal Nav1.6 y, en particular, la variante *SCN8A-18A* favorecen la proliferación en células HeLa que son aquellas con fenotipo metastásico más agresivo respecto a SiHa y C33A. Sin embargo, existe al menos otra

posibilidad ya que la muerte celular se puede presentar por apoptosis o por necrosis, por lo que es necesario realizar experimentos de cuantificación de apoptosis para corroborar que esta es inducida por el tratamiento con siRNA contra *SCN8A-18A*. En la literatura existe ya un antecedente en este mismo contexto; en sarcoma de Ewing se demostró un papel del canal Nav1.6 en la apoptosis, pero en este caso, es la regulación a la baja del canal lo que permite la evasión de la apoptosis en este tipo de cáncer (Hernandez-Muñoz *et al.*, 2016).

Ensayos de Migración

El desprendimiento de las células cancerosas de sus tumores originales es un evento primario y esencial para que las células tumorales hijas colonicen y se restablezcan en un sitio secundario y es probable que esto ocurra por modificaciones genéticas que les permitan a las células adquirir potencial migratorio (Ribelles *et al.*, 2014). El ensayo de cierre de “herida” es un método simple, pero efectivo para estudiar la migración celular en dos dimensiones y en una sola dirección que es perpendicular a la “herida” (Cory, 2011). Sin embargo, es necesario arrestar el ciclo celular de las células empleadas en este ensayo para poder asegurar que el cierre de “herida” se debe únicamente a la capacidad migratoria y no debido a que la proliferación celular está presente. La mitomicina C es un antibiótico natural que se aisló originalmente del microorganismo *Streptomyces castiposus*, y que ejerce actividad antitumoral al dañar el DNA a través de alquilaciones e interrumpir el ciclo celular (Seow *et al.*, 2004). Por esta razón se optó por utilizar este fármaco para los ensayos de migración celular.

En células HeLa se encontró que a diferencia de SiHa y C33A presentaban cierta resistencia a la incubación de 2 h con 12 μ M de Mitomicina C, sin embargo, cuando se incubaron con la misma concentración del fármaco, pero durante el doble de tiempo (4 h), el efecto fue evidente y los resultados en la migración mostraron una tendencia similar a SiHa y C33A (**Fig. 28**).

Las variantes *SCN8A-18A* y *SCN8A-Δ18* tienen un efecto similar sobre la migración en células SiHa, cuando se abate la expresión de estas de manera individual se observa una tendencia a la reducción de la migración a las 48 h post herida, y el efecto se vuelve significativo al abatir su expresión de forma simultánea (**Fig. 28A**). Aún más, al seguir el cierre de herida hasta las 72 h post herida el efecto en los tres tratamientos es más robusto, observándose incluso un efecto aditivo en la condición de cotransfección (**Fig. 28B**). En cuanto a las células HeLa y C33A, el canal Nav1.6 no tiene un efecto aparente sobre la migración celular, ya que en estas células no se observa una tendencia clara como se ve en las células SiHa desde las 48 h post herida. Los resultados del presente trabajo indican que hay una reducción significativa de la migración relativa con los tratamientos de silenciamiento de las variantes del exón 18 de *SCN8A* en células SiHa que son positivas a VPH-16. Esta observación es consistente con resultados previos de nuestro grupo de investigación en los que se observó una tendencia a la reducción de la migración en cultivos primarios de biopsias de CaCu positivas a VPH-16 (Hernandez-Plata *et al.*, 2012). Algunos otros trabajos han reportado la participación de canales Nav1.5 en la migración celular de cáncer de mama (Fraser *et al.*, 2005; Brackenbury *et al.*, 2007) y ovario (Gao *et al.*, 2010); y más recientemente del canal Nav1.7 en cáncer medular de tiroides (Pukkanasut *et al.*, 2023). No obstante, los mecanismos de acción involucrados en la actividad pro-migratoria de los canales Nav no ha sido dilucidada a la fecha.

Ensayos de Invasión

Nuestro grupo de investigación fue pionero en reportar la sobreexpresión del canal Nav1.6 (alrededor de 40 veces más) en cultivos primarios de biopsias de CaCu humano respecto al tejido cervical no canceroso (CNC) y se demostró que el bloqueo específico de Nav1.6 conducía a una disminución en la invasión celular, lo cual sugiere que estos canales juegan un importante papel en la progresión del CaCu (Hernandez-Plata *et al.*,

2012). El gen *SCN8A* que codifica para el canal Nav1.6 genera cinco variantes mediante el procesamiento alternativo del mRNA e interesantemente, la expresión en vesículas intracelulares de la variante *SCN8A-Δ18* ha sido descrita en macrófagos derivados de leucemia y en células de melanoma donde regula la formación de podosomas e invadopodios (Carrithers *et al.*, 2009).

Los experimentos de invasión en líneas celulares de CaCu humano muestran que en las condiciones de silenciamiento de las variantes *SCN8A-18A*, *SCN8A-Δ18*, así como el silenciamiento simultáneo de ambas, inducen un efecto evidente al reducir el porcentaje de invasión celular, aunque de manera diferencial. En consistencia con lo observado previamente en cultivos primarios de CaCu positivos a VPH-16 (Hernández-Plata *et al.*, 2012), las células SiHa (también positivas a VPH-16) muestran una reducción importante en la invasividad al abatir la expresión de las variantes de Nav1.6, pero es más evidente al abatir selectivamente la expresión de *SCN8A-18A*, pues la condición de cotransfección con la variante *SCN8A-Δ18* arrojó el mismo resultado de transfectar solo el siRNA contra la variante adulta (**Fig. 30A**). Por el contrario, en las células HeLa la variante adulta no tiene un efecto en la invasión y solo la variante *SCN8A-Δ18* (sola o en cotransfección) induce una tendencia a disminuir la invasividad de estas células sin llegar a ser significativa dichas diferencias (**Fig. 30B**). Los resultados anteriores sugieren una contribución diferencial de las variantes *SCN8A-18A* y *SCN8A-Δ18* en la invasividad del cáncer cervicouterino. Cuando los niveles del gen *SCN8A* son muy altos respecto al tejido no canceroso (células SiHa y cultivos primarios de CaCu; Hernandez-Plata *et al.*, 2012) la variante adulta tiene una contribución más robusta en la invasividad, pero cuando la sobreexpresión de dicho gen no es muy elevada (células HeLa y biopsias de CaCu positivas a VPH-18; Lopez-Charcas *et al.*, 2018), la variante *SCN8A-Δ18* parece ser más relevante para la invasividad celular. Esta interpretación también implica que la expresión del gen *SCN8A* está relacionada con el tipo de VPH

causante del cáncer, es decir, el VPH-16 induce una sobreexpresión más robusta del gen que codifica para el canal Nav1.6 que el CaCu causado por la infección con el VPH-18. La observación en células C33A de que la invasividad no se modificó de manera significativa al transfectar los siRNAs contra las dos variantes es consistente con la contribución diferencial de las variantes *SCN8A-Δ18* y *SCN8A-Δ18* en función del tipo de VPH presente en las células de CaCu.

En trabajos anteriores hemos reportado que las células HeLa (VPH-18, derivadas de adenocarcinoma) presentan el fenotipo más invasivo entre diferentes tipos de líneas celulares de CaCu (HeLa, SiHa y CasKi; Sanchez-Sandoval y Gomora, 2019), no obstante que expresan los niveles más bajos de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A* respecto a las otras líneas celulares estudiadas. Sin embargo, el abatimiento de la variante *SCN8A-Δ18* (de manera individual y en cotransfección) tiene un efecto discreto (aunque la tendencia es clara) en la disminución de la invasividad de dichas células. Es probable, que el alto índice de invasividad de las células Hela se deba a la participación de otras proteínas y cascadas de señalización. De hecho, en el mismo trabajo de Sanchez-Sandoval y Gomora (2019) se demuestra la participación de la subunidad Navβ4 como una proteína con propiedades anti invasivas en los tres tipos celulares de CaCu estudiados en ese trabajo.

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio del papel de las isoformas de Nav1.6, que ya ha sido propuesto como marcador molecular del CaCu y como un potencial blanco molecular para mitigar las propiedades metastásicas de este carcinoma. La variante *SCN8A-Δ18* tiene esta denominación porque carece por completo del exón 18, lo que da como resultado una proteína a la que le falta el segmento S4 (sensor de voltaje) y parte del segmento S3 del dominio III (**Fig. 10B**). La funcionalidad de esta proteína como canal de Na⁺ fue comprobada por Carrithers *et al.* (2009) y en este mismo estudio mostraron la colocalización intracelular de *SCN8A-Δ18* con F y β-actina, proteínas

involucradas en la formación de podosomas e invadopodios. Importantemente, en nuestro grupo de investigación también se reportó que la β -actina se encuentra expresada alrededor de 1000 veces más en cultivos primarios de CaCu con respecto al tejido CNC, lo que confirma una asociación entre los canales Nav1.6 y el comportamiento invasivo en células CaCu (Hernandez-Plata *et al.*, 2012). En ese mismo trabajo también se investigó la localización de la proteína del canal Nav1.6 mediante inmunocitoquímica y los resultados mostraron que en el CaCu se encuentra distribuida en compartimientos intracelulares y en la membrana plasmática a diferencia del tejido CNC donde solo se localiza en la membrana plasmática. Sin embargo, falta explorar si efectivamente la variante *SCN8A- Δ 18* se localiza en compartimientos intracelulares en células CaCu, porque el hecho de que en las líneas celulares no se registran corrientes de Na^+ (Lopez-Charcas *et al.*, 2018) podría obedecer a una dependencia del voltaje distinta de la variante *SCN8A- Δ 18* al carecer de uno de los cuatro sensores de voltaje que se presentan en la variante adulta. De hecho, en los canales Nav1.4 y Nav1.5 se ha reportado que las diferencias de aminoácidos en regiones de los sensores de voltaje modifican la activación del canal (Groome *et al.*, 2014; Lacroix *et al.*, 2013; Mancino *et al.*, 2022). Ahora bien, si se confirma la localización intracelular de la variante *SCN8A- Δ 18* podríamos pensar en un mecanismo para promover la invasión como el sugerido por Carrithers *et al.* (2009), en el que el flujo intracelular de Na^+ (del interior de vesículas intracelulares al citosol) y la actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ de la mitocondria promueven un aumento en la concentración intracelular de Ca^{++} y esto a su vez se asocia con la activación de moléculas dependientes de Ca^{++} como la gelsolina que se une a filamentos de actina y promueve su ensamblaje y desensamblaje (Chellaiah *et al.*, 2000).

Por otra parte, además de la formación de estructuras como invadopodios para la motilidad celular, las células cancerosas deben ser capaces de degradar la matriz extracelular para tener un comportamiento invasivo. En 2018 nuestro grupo de

investigación encontró que la expresión y actividad de la metaloproteinasa de matriz tipo 2 (MMP-2) aumenta cuando se sobreexpresa el canal Nav1.6 (variante *SCN8A-18A*) en líneas celulares de CaCu y que la actividad de MMP-2 es mucho más notoria en células SiHa (VPH-16) que en HeLa (VPH-18) y C33A (negativo a VPH) (Lopez-Charcas *et al.*, 2018). Curiosamente, los hallazgos en el presente trabajo sugieren que cuando se abate la expresión de la variante *SCN8A-18A* la reducción en el porcentaje de invasión es mucho mayor en células SiHa respecto a lo encontrado en células HeLa y C33A. Esto sugiere la posibilidad de que el mecanismo por el cual la variante *SCN8A-Δ18* participa en la invasión celular es diferente, lo cual genera otra interrogante que se considera dentro de las perspectivas de este trabajo.

Los resultados del presente trabajo indican una participación de la variante *SCN8A-Δ18* en la invasión relativa de las células HeLa, mientras que la variante *SCN8A-18A* parece estar asociada a este fenómeno solo en células SiHa y con menor robustez en C33A. Estos resultados *per se* son una contribución importante al conocimiento sobre el papel del canal Nav1.6 en el comportamiento metastásico del CaCu. Aún más relevante resulta la observación de que la variante *SCN8A-Δ18* contribuye de manera importante en la capacidad invasiva del CaCu positivo a VPH-18, lo cual significa un potencial blanco molecular para el abatimiento de las propiedades metastásicas de este tipo de CaCu. Debido a que la variante *SCN8A-Δ18* no contribuye a la excitabilidad celular asociada a la variante adulta, es posible entonces diseñar estrategias terapéuticas dirigidas al abatimiento de la variante *SCN8A-Δ18* con el propósito de mitigar la capacidad metastásica del CaCu sin afectar la excitabilidad celular de aquellas células donde se expresen ambas variantes como pueden ser las neuronas y otras células excitables, así como las células epiteliales del cuello uterino no canceroso.

CONCLUSIONES

- La eficiencia de la transfección de siRNAs en células CaCu con el reactivo empleado es de más del 90%.
- El silenciamiento con siRNAs específicos es efectivo a partir de las 48 h para la variante *SCN8A-18A* y a partir de las 24 h para la variante *SCN8A-Δ18* en las tres líneas celulares. Por otra parte, el silenciamiento simultáneo de estas variantes no es tan efectivo como en los silenciamientos individuales.
- Las condiciones de silenciamiento disminuyen importantemente la proliferación celular en las tres líneas celulares.
- La variante *SCN8A-18A* afecta la viabilidad celular en células HeLa (VPH-18), por lo que se plantea la interrogante de su posible participación en la apoptosis.
- La migración celular es afectada por las variantes *SCN8A-18A* y *SCN8A-Δ18* en células SiHa (VPH-16), sin embargo, este efecto no se observa en HeLa (VPH-18) y C33A (negativo a VPH).
- Las variantes *SCN8A-18A* y *SCN8A-Δ18* tienen un papel relevante y diferencial en la invasividad de las células de CaCu. La variante 18A disminuye este comportamiento celular de manera robusta en las células SiHa (VPH-16) y se muestra la misma tendencia en las células C33A (negativo a VPH), mientras que la variante $\Delta 18$ tiene efecto sobre las células HeLa (VPH-18).

PERSPECTIVAS

Los resultados de este trabajo de maestría plantean nuevas interrogantes que serán abordadas durante mi proyecto de doctorado. Para lo cual se han planteado de manera general los siguientes objetivos:

1. Estudiar el papel de la variante 18A y $\Delta 18$ en la apoptosis en células HeLa (VPH-18), SiHa (VPH-16) y C33A (negativo a VPH).
2. Evaluar el efecto de los niveles de expresión de las variantes del exón 18 del gen *SCN8A* en la concentración intracelular del ion Na^+ y en el potencial de membrana en las líneas celulares de CaCu.
3. Dilucidar las vías de señalización por las que el canal Nav1.6 (variantes 18A y $\Delta 18$) promueve la proliferación celular y la invasividad en las líneas celulares de CaCu.

REFERENCIAS

- Angus, M., & Ruben, P. (2019). Voltage gated sodium channels in cancer and their potential mechanisms of action. *Channels*, 13(1), 400. <https://doi.org/10.1080/19336950.2019.1666455>
- Brackenbury, W. J., Chioni, A. M., Diss, J. K. J., & Djamgoz, M. B. A. (2007). The neonatal splice variant of Nav1.5 potentiates in vitro invasive behaviour of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 101(2), 149. <https://doi.org/10.1007/S10549-006-9281-1>
- Burbidge, S. A., Dale, T. J., Powell, A. J., Whitaker, W. R. J., Xie, X. M., Romanos, M. A., & Clare, J. J. (2002). Molecular cloning, distribution and functional analysis of the NAV1.6. Voltage-gated sodium channel from human brain. *Molecular Brain Research*, 103(1–2), 80–90. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(02\)00188-2](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(02)00188-2)
- Campbell, T. M., Main, M. J., & Fitzgerald, E. M. (2013). Functional expression of the voltage-gated Na⁺-channel Nav1.7 is necessary for EGF-mediated invasion in human non-small cell lung cancer cells. *Journal of Cell Science*, 126(Pt 21), 4939–4949. <https://doi.org/10.1242/JCS.130013>
- Carrithers, M. D., Chatterjee, G., Carrithers, L. M., Offoha, R., Iheagwara, U., Rahner, C., Graham, M., & Waxman, S. G. (2009). Regulation of podosome formation in macrophages by a splice variant of the sodium channel SCN8A. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(12), 8114–8126. <https://doi.org/10.1074/JBC.M801892200>
- Catterall, W. A., Goldin, A. L., & Waxman, S. G. (2003). International Union of Pharmacology. XXXIX. Compendium of voltage-gated ion channels: sodium channels. *Pharmacological Reviews*, 55(4), 575–578. <https://doi.org/10.1124/PR.55.4.7>
- Catterall, W. A., Goldin, A. L., & Waxman, S. G. (2005). International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 397–409. <https://doi.org/10.1124/PR.57.4.4>
- Chellaiah M, Kizer N, Silva M, Alvarez U, Kwiatkowski D, Hruska KA. (2000). Gelsolin deficiency blocks podosome assembly and produces increased bone mass and strength. *J Cell Biol*. 148(4):665-78. doi: 10.1083/jcb.148.4.665. PMID: 10684249; PMCID: PMC2169374.
- Chen, H. C. (2005). Boyden Chamber Assay. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 294, 15–22. <https://doi.org/10.1385/1-59259-860-9:015>
- Cohen, P., Jhingran, A., Oaknin, A., & Denny, L. (2019). Cervical cancer. *Lancet (London, England)*, 393(10167), 169–182. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32470-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32470-X)
- Cory G. (2011). Scratch-wound assay. *Methods Mol Biol*. 769:25-30.
- Dahlström, L. A., Andersson, K., Luostarinen, T., Thoresen, S., Ögmundsdóttir, H., Tryggvadóttir, L., Wiklund, F., Skare, G. B., Eklund, C., Sjölin, K., Jellum, E., Koskela, P., Wadell, G., Lehtinen, M., & Dillner, J. (2011). Prospective seroepidemiologic study of human papillomavirus and other risk factors in cervical cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 20(12), 2541–2550. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-11-0761>
- de Freitas AC, Gurgel AP, Chagas BS, Coimbra EC, do Amaral CM. (2012). Susceptibility to cervical cancer: an overview. *Gynecol Oncol*. 126(2):304-11. doi: 10.1016/j.ygyno.2012.03.047. Epub 2012 Apr 4.

- Delgado-Herrera, D. (2021). *Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas “ Participación de las variantes del exón 18 del gen SCN8A en el cáncer cervicouterino .”*
- Díaz, D., Delgadillo, D. M., Hernández-Gallegos, E., Ramírez-Domínguez, M. E., Hinojosa, L. M., Ortiz, C. S., Berumen, J., Camacho, J., & Gomora, J. C. (2007). Functional Expression of Voltage-Gated Sodium Channels in Primary Cultures of Human Cervical Cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 210, 469–478. <https://doi.org/10.1002/JCP>
- Diss, J. K. J., Archer, S. N., Hirano, J., Fraser, S. P., & Djamgoz, M. B. A. (2001). Expression profiles of voltage-gated Na⁺ channel α -subunit genes in rat and human prostate cancer cell lines. *The Prostate*, 48(3), 165–178. <https://doi.org/10.1002/PROS.1095>
- Djamgoz, M. B. A., Fraser, S. P., & Brackenbury, W. J. (2019). In vivo evidence for voltage-gated sodium channel expression in carcinomas and potentiation of metastasis. *Cancers*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/cancers11111675>
- Fraser, S. P., Diss, J. K. J., Chioni, A. M., Mycielska, M. E., Pan, H., Yamaci, R. F., Pani, F., Siwy, Z., Krasowska, M., Grzywna, Z., Brackenbury, W. J., Theodorou, D., Koyutürk, M., Kaya, H., Battaloglu, E., De Bella, M. T., Slade, M. J., Tolhurst, R., Palmieri, C., ... Djamgoz, M. B. A. (2005). Voltage-Gated Sodium Channel Expression and Potentiation of Human Breast Cancer Metastasis. *Clinical Cancer Research*, 11(15), 5381–5389. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0327>
- Fraser, S. P., & Pardo, L. A. (2008). Ion channels: functional expression and therapeutic potential in cancer. Colloquium on Ion Channels and Cancer. *EMBO Reports*, 9(6), 512. <https://doi.org/10.1038/EMBOR.2008.75>
- Gao, R., Shen, Y., Cai, J., Lei, M., & Wang, Z. (2010). Expression of voltage-gated sodium channel α subunit in human ovarian cancer. *Oncology Reports*, 23(5), 1293–1299. https://doi.org/10.3892/OR_00000763/HTML
- Globocan. (2021). *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=3&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group
- Groome JR, Lehmann-Horn F, Fan C, Wolf M, Winston V, Merlini L, Jurkat-Rott K. (2014). Nav1.4 mutations cause hypokalaemic periodic paralysis by disrupting III S4 movement during recovery. *Brain*. 137(Pt 4):998-1008. doi: 10.1093/brain/awu015. PMID: 24549961; PMCID: PMC3959555.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2016). Biological hallmarks of cancer. *Holland-Frei Cancer Medicine*, 1-10.
- Hernandez-Muñoz, I., Figuerola, E., Sanchez-Molina, S., Rodriguez, E., Fernández-Mariño, A. I., Pardo-Pastor, C., Bahamonde, M. I., Fernández-Fernández, J. M., García-Domínguez, D. J., Hontecillas-Prieto, L., Lavarino, C., Carcaboso, A. M., De Torres, C., Tirado, O. M., De Alava, E., & Mora, J. (2016). RING1B contributes to Ewing sarcoma development by repressing the Nav1.6 sodium channel and the NF- κ B pathway, independently of the fusion oncoprotein. *Oncotarget*, 7(29), 46283–46300. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10092>
- Hernández-Plata, E., Ortiz, C. S., Marquina-Castillo, B., Medina-Martínez, I., Alfaro, A.,

- Berumen, J., Rivera, M., & Gomora, J. C. (2012). Overexpression of Na V1.6 channels is associated with the invasion capacity of human cervical cancer. *International Journal of Cancer*, 130(9), 2013–2023. <https://doi.org/10.1002/ijc.26210>
- Hille, B. (2001). *Ion channels of excitable membranes* (third). Sinauer Associates. <https://doi.org/10.4324/9780429449680-1>
- Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1952). A QUANTITATIVE DESCRIPTION OF MEMBRANE CURRENT AND ITS APPLICATION TO CONDUCTION AND EXCITATION IN NERVE. *J. Physiol.*, 117, 500–544. <https://doi.org/10.1109/ICCCT2.2017.7972284>
- House, C. D., Vaske, C. J., Schwartz, A. M., Obias, V., Frank, B., Luu, T., Sarvazyan, N., Irby, R., Strausberg, R. L., Hales, T. G., Stuart, J. M., & Lee, N. H. (2010). Voltage-gated Na⁺ channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion. *Cancer Research*, 70(17), 6957. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1169>
- Igci, Y., Bozgeyik, E., Borazan, E., Pala, E., Suner, A., Ulasli, M., Gurses, S., Yumrutas, O., Balik, A., & Igci, M. (2015). Expression profiling of SCN8A and NDUFC2 genes in colorectal carcinoma | Experimental oncology. *Exp Oncol.*, 37(1), 77–80. <https://exp-oncology.com.ua/article/7454>
- Instituto Nacional De Salud Pública. (2020). *La investigación detrás de...* <https://www.insp.mx/avisos/5120-investigacion-detras-vph-cancer.html>
- International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. (2007). Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: Collaborative reanalysis of individual data on 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. *International Journal of Cancer*, 120(4), 885–891. <https://doi.org/10.1002/ijc.22357>
- Isom, L. L. (2001). Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 7(1), 42–54. <https://doi.org/10.1177/107385840100700108>
- James AD, Leslie TK, Kaggie JD, Wiggins L, Patten L, Murphy O'Duinn J, Langer S, Labarthe MC, Riemer F, Baxter G, McLean MA, Gilbert FJ, Kennerley AJ, Brackenbury WJ. (2022). Sodium accumulation in breast cancer predicts malignancy and treatment response. *Br J Cancer*. 127(2):337-349. doi: 10.1038/s41416-022-01802-w. PMID: 35462561; PMCID: PMC9296657.
- Lacroix JJ, Campos FV, Frezza L, Bezanilla F. (2013). Molecular bases for the asynchronous activation of sodium and potassium channels required for nerve impulse generation. *Neuron*. 79(4):651-7. doi: 10.1016/j.neuron.2013.05.036. PMID: 23972594; PMCID: PMC3907179.
- Lee, C. H., & Ruben, P. C. (2008). Interaction between voltage-gated sodium channels and the neurotoxin, tetrodotoxin. [Http://Dx.Doi.Org/10.4161/Chan.2.6.7429](http://Dx.Doi.Org/10.4161/Chan.2.6.7429), 2(6), 407–412. <https://doi.org/10.4161/CHAN.2.6.7429>
- Li, H., Liu, J., Fan, N., Wang, H., Thomas, AM., Yan, Q., Li, S., Qin, H. (2022). Nav1.6 promotes the progression of human follicular thyroid carcinoma cells via JAK-STAT signaling pathway. *Pathol Res Pract*. 236:153984. doi: 10.1016/j.prp.2022.153984. PMID: 35753135.
- Lipscombe, D. (2001). What Are Ion Channels and Why Do Cells Need Them? *Encyclopedia of Life Sciences*.

- Liu, J., Liu, D., Liu, J. J., Zhao, C., Yao, S., & Hong, L. (2018). Blocking the Nav1.5 channel using eicosapentaenoic acid reduces migration and proliferation of ovarian cancer cells. *International Journal of Oncology*, 53(2), 855–865. <https://doi.org/10.3892/IJO.2018.4437/HTML>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>
- Lopez-Charcas, O., Espinosa, A. M., Alfaro, A., Herrera-Carrillo, Z., Ramirez-Cordero, B. E., Cortes-Reynosa, P., Perez Salazar, E., Berumen, J., & Gomora, J. C. (2018). The invasiveness of human cervical cancer associated to the function of Nav1.6 channels is mediated by MMP-2 activity. *Scientific Reports*, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31364-y>
- Lopez-Charcas, O., Pukkanasut, P., Velu, S. E., Brackenbury, W. J., Hales, T. G., Besson, P., Gomora, J. C., & Roger, S. (2021). Pharmacological and nutritional targeting of voltage-gated sodium channels in the treatment of cancers. *IScience*, 24(4). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102270>
- Mancino AS, Glass WG, Yan Y, Biggin PC, Bowie D. (2022). Spliced isoforms of the cardiac Nav1.5 channel modify channel activation by distinct structural mechanisms. *J Gen Physiol*. 154(5):e202112906. doi: 10.1085/jgp.202112906. PMID: 35297947; PMCID: PMC8939363.
- Narahashi, T. (2008). Tetrodotoxin — A brief history —. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 84(5), 147. <https://doi.org/10.2183/PJAB.84.147>
- Organización Mundial de la Salud. (2021). *Cáncer*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Ortiz-Quintero, B. (2009). RNA de interferencia: Origen y aplicación en el silenciamiento de genes. *Revista de Investigación Clínica*, 61, 412–427.
- Pan, Y., Zhang, H., Zhang, M., Zhu, J., Yu, J., Wang, B., Qiu, J., & Zhang, J. (2017). A five-gene based risk score with high prognostic value in colorectal cancer. *Oncology Letters*, 14(6), 6724. <https://doi.org/10.3892/OL.2017.7097>
- Peng, J., Ou, Q., Wu, X., Zhang, R., Zhao, Q., Jiang, W., Lu, Z., Wan, D., Pan, Z., & Fang, Y. (2017). Expression of voltage-gated sodium channel Nav1.5 in non-metastatic colon cancer and its associations with estrogen receptor (ER)- β expression and clinical outcomes. *Chinese Journal of Cancer*, 36(1), 89. <https://doi.org/10.1186/S40880-017-0253-0>
- Plummer, N. W., McBurney, M. W., & Meisler, M. H. (1997). Alternative Splicing of the Sodium Channel SCN8A Predicts a Truncated Two-domain Protein in Fetal Brain and Non-neuronal Cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(38), 24008–24015. <https://doi.org/10.1074/JBC.272.38.24008>
- Pukkanasut P, Whitt J, Guenter R, Lynch SE, Gallegos C, Rosendo-Pineda MJ, Gomora JC, Chen H, Lin D, Sorace A, Jaskula-Sztul R, Velu SE. (2023). Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.7 Inhibitors with Potent Anticancer Activities in Medullary Thyroid Cancer Cells. *Cancers (Basel)*. 15(10):2806. doi: 10.3390/cancers15102806.
- Ribelles N, Santonja A, Pajares B, Llácer C, Alba E. (2014). The seed and soil hypothesis revisited: current state of knowledge of inherited genes on prognosis in breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 40(2):293-9.
- Roger, S., Besson, P., & Le Guennec, J. Y. (2003). Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. *Biochimica et Biophysica Acta*

- (BBA) - *Biomembranes*, 1616(2), 107–111. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2003.07.001>
- Roura, E., Castellsagué, X., Pawlita, M., Travier, N., Waterboer, T., Margall, N., Bosch, F. X., De Sanjosé, S., Dillner, J., Gram, I. T., Tjønneland, A., Munk, C., Pala, V., Palli, D., Khaw, K. T., Barnabas, R. V., Overvad, K., Clavel-Chapelon, F., Boutron-Ruault, M. C., ... Riboli, E. (2014). Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: results from the EPIC cohort. *International Journal of Cancer*, 135(2), 453–466. <https://doi.org/10.1002/IJC.28666>
- Salvage SC, Huang CL, Jackson AP. (2020). Cell-Adhesion Properties of β -Subunits in the Regulation of Cardiomyocyte Sodium Channels. *Biomolecules*. 10(7):989. doi: 10.3390/biom10070989. PMID: 32630316
- Sanchez-Sandoval, A. L., & Gomora, J. C. (2019). Contribution of voltage-gated sodium channel β -subunits to cervical cancer cells metastatic behavior. *Cancer Cell International*, 19(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0757-6>
- Sarao, R., Gupta, S. K., Auld, V. J., & Dunn, R. J. (1991). Developmentally regulated alternative RNA splicing of rat brain sodium channel mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 19(20), 5673–5679. <https://doi.org/10.1093/NAR/19.20.5673>
- Schiavon, E., Sacco, T., Cassulini, R. R., Gurrola, G., Tempia, F., Possani, L. D., & Wanke, E. (2006). Resurgent current and voltage sensor trapping enhanced activation by a beta-scorpion toxin solely in Nav1.6 channel. Significance in mice Purkinje neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(29), 20326–20337. <https://doi.org/10.1074/JBC.M600565200>
- Schiffman, M., Doorbar, J., Wentzensen, N., De Sanjosé, S., Fakhry, C., Monk, B. J., Stanley, M. A., & Franceschi, S. (2016). Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature Reviews Disease Primers* 2016 2:1, 2(1), 1–20. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.86>
- SCIENCES, E. M. (2021). *Neubauer Haemocytometry*. <https://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/68052-14.aspx>
- Seow HA, Penketh PG, Baumann RP, Sartorelli AC. (2004). Bioactivation and resistance to mitomycin C. *Methods Enzymol*. 382:221-33.
- Shipley, G. L. (2006). An introduction to real-time PCR. In M. T. Dorak (Ed.), *Real-time PCR* (p. 333).
- Steben M, Duarte-Franco E. (2007). Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecol Oncol*. 107(2 Suppl 1):S2-5. doi: 10.1016/j.ygyno.2007.07.067.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>
- Xia, J., Huang, N., Huang, H., Sun, L., Dong, S., Su, J., Zhang, J., Wang, L., Lin, L., Shi, M., Bin, J., Liao, Y., Li, N., & Liao, W. (2016). Voltage-gated sodium channel Nav 1.7 promotes gastric cancer progression through MACC1-mediated upregulation of NHE1. *International Journal of Cancer*, 139(11), 2553–2569. <https://doi.org/10.1002/IJC.30381>
- Yang M, Brackenbury WJ. (2013). Membrane potential and cancer progression. *Front Physiol*. 4:185. doi: 10.3389/fphys.2013.00185. PMID: 23882223; PMCID: PMC3713347.
- Yang M, James AD, Suman R, Kasprovicz R, Nelson M, O'Toole PJ, Brackenbury WJ. (2020). Voltage-dependent activation of Rac1 by Nav 1.5 channels promotes cell migration. *J Cell Physiol*. 235(4):3950-3972. doi: 10.1002/jcp.29290. PMID: 31612502; PMCID: PMC6973152.

Yu, F. H., & Catterall, W. A. (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biology*, 4(3), 1–7. <https://doi.org/10.1186/GB-2003-4-3-207/FIGURES/3>