



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

PARTICIPACIÓN DE LOS CANALES DE SODIO  
ACTIVADOS POR VOLTAJE EN LAS PROPIEDADES  
METASTÁSICAS DE LÍNEAS CELULARES DE  
CÁNCER CERVICOUTERINO: REGULACIÓN POR  
ESTRADIOL, EGF Y SUBUNIDADES BETA.

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

**Q.F.B. ANA LAURA SÁNCHEZ SANDOVAL**

Dr. Juan Carlos Gómora Martínez  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dra. Elizabeth Langley McCarron  
Dra. Leticia Rocha Zavaleta

Instituto Nacional de Cancerología  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MEXICO, D.F. MARZO 2013



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO 

---

---

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

PARTICIPACIÓN DE LOS CANALES DE SODIO  
ACTIVADOS POR VOLTAJE EN LAS PROPIEDADES  
METASTÁSICAS DE LÍNEAS CELULARES DE  
CÁNCER CERVICOUTERINO: REGULACIÓN POR  
ESTRADIOL, EGF Y SUBUNIDADES BETA.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

**ANA LAURA SÁNCHEZ SANDOVAL**

TUTOR: DR. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ

MÉXICO, D. F.

MARZO 2013

JURADO ASIGNADO:

**PRESIDENTE:**        **Dra. Marcia Hiriart Urdanivia**  
**VOCAL:**                **Dra. Marcela Lizano Soberón**  
**VOCAL:**                **Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez**  
**VOCAL:**                **Dr. Alejandro García Carrancá**  
**SECRETARIO:**        **Dra. María Elena Ibarra Rubio**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

ASESOR:

**Dr. Juan Carlos Gómora Martínez**

SUSTENTANTE:

**Q.F.B. Ana Laura Sánchez Sandoval**

## RECONOCIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Juan Carlos Gómora Martínez, por ser un excelente tutor, guiarme en este proceso y apoyarme en todo momento.

A la Dra. Elizabeth Langley McCarron, del Instituto Nacional de Cancerología, por ser parte de mi comité tutor y asesorarme durante toda la maestría, así como permitirme trabajar en su laboratorio para la realización de los experimentos de actividad estrogénica nuclear.

A la Dra. Leticia Rocha Zavaleta, del Instituto de Investigaciones Biomédicas por toda la orientación que me brindó como parte de mi comité tutor a lo largo de la maestría.

A la Dra. Clara Estela Díaz Velásquez, por el apoyo técnico en el laboratorio durante la primera parte del proyecto.

A la Dra. Zazil Herrera Carrillo, por el apoyo técnico en el laboratorio durante la parte final del proyecto.

A la Dra. Lourdes Massieu Trigo, del Instituto de Fisiología Celular, por permitirme usar su lector de placas multipozos para los ensayos de migración e invasividad.

Al Dr. Edward Pérez Reyes, de la Universidad de Virginia, de los EUA, quien amablemente nos proporcionó el plásmido que contiene la secuencia completa del canal  $Na_v1.6$ .

Se reconoce el apoyo brindado por la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, en donde se realizaron los experimentos de PCR en tiempo real y las secuenciaciones.

Se reconoce el apoyo brindado por la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, en donde se capturaron las fotografías de epifluorescencia.

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

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

El proyecto fue apoyado por CONACYT (167790), a partir del cual se me proporcionó una beca de asistente de proyecto nivel II, y el PAPIIT (IN208611-3) de la DGAPA, UNAM, mismo que me proporcionó una beca como apoyo a la escritura de tesis.

## CONTENIDO

<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Cáncer cervicouterino</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Canales iónicos activados por voltaje</b>	<b>6</b>
2.2.1. <i>Canales de sodio activados por voltaje</i>	6
<b>2.3. Canales iónicos en el cáncer</b>	<b>9</b>
2.3.1. <i>Canales de potasio</i>	9
2.3.2. <i>Canales de calcio</i>	10
2.3.3. <i>Canales de sodio</i>	11
<b>2.4. Canales iónicos en CaCu</b>	<b>13</b>
<b>2.5. Papel del estradiol en el CaCu</b>	<b>13</b>
<b>2.6. Papel del factor de crecimiento epidermal en el cáncer</b>	<b>15</b>
<b>3. ANTECEDENTES DIRECTOS</b>	<b>16</b>
<b>4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
4.1 Hipótesis	20
4.2 Objetivo General	20
4.3 Objetivos Específicos	20
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>21</b>
5.1. Cultivos celulares	21
5.2. Extracción del RNA	22
5.3. RT-PCR estándar	22
5.4. Subclonación de productos de la RT-PCR estándar	25
5.5. PCR en tiempo real	25
5.6. Actividad estrogénica nuclear en líneas celulares de CaCu	28
5.7. Tratamiento con estrógenos	29
5.8. Tratamiento con factor de crecimiento epidermal	30
5.9. Registros electrofisiológicos	30
5.10. Abatimiento de la expresión de subunidades $\beta$ de canales $Na_v$	31
5.11. Inmunocitoquímica	32

5.12. Transfección del canal Na <sub>v</sub> 1.6 _____	33
5.13. Ensayos de migración e invasividad _____	33
<b>6. RESULTADOS _____</b>	<b>35</b>
<b>6.1. Identificación de los mensajeros de las subunidades <math>\alpha</math> y <math>\beta</math> de los canales Na<sub>v</sub> en las líneas celulares de CaCu _____</b>	<b>35</b>
6.1.1 Identificación de las subunidades $\alpha$ y $\beta$ de los canales Na <sub>v</sub> por RT-PCR estándar _____	35
6.1.2 Registro de corrientes de sodio en las líneas celulares de CaCu _____	35
<b>6.2. Determinación del efecto del estradiol y del factor de crecimiento epidermal en la expresión de los canales Na<sub>v</sub> en líneas celulares de CaCu _____</b>	<b>37</b>
6.2.1. Identificación del mRNA de receptores nucleares de estrógenos por RT-PCR de punto final _____	37
6.2.2. Actividad estrogénica nuclear _____	41
6.2.3. Ensayo de proliferación en presencia de $\beta$ -estradiol _____	42
6.2.4. Efecto del $\beta$ -estradiol en la expresión funcional de los canales Na <sub>v</sub> _____	43
6.2.5. Ensayo de proliferación de células CaSki en presencia de EGF _____	44
6.2.6. Efecto del EGF en la expresión funcional de los canales Na <sub>v</sub> _____	44
<b>6.3. Participación de las subunidades <math>\beta</math> en el fenotipo de las líneas celulares de CaCu _____</b>	<b>45</b>
6.3.1. Análisis de la expresión génica de las subunidades $\beta$ por PCR en tiempo real _____	45
6.3.2. Abatimiento de la expresión de subunidades $\beta$ de los canales Na <sub>v</sub> _____	46
6.3.3. Ensayos de migración e invasividad _____	48
6.3.4. Registro de corrientes de sodio en células CaSki transfectadas con el canal Na <sub>v</sub> 1.6 _____	51
6.3.5. Inmunodetección de las subunidades Na <sub>v</sub> $\beta$ 1 y Na <sub>v</sub> $\beta$ 2 _____	53
<b>7. DISCUSIÓN _____</b>	<b>54</b>
7.1. Expresión de canales Na <sub>v</sub> en líneas celulares de CaCu _____	54
7.2. Efecto del estradiol y EGF en la expresión de los canales Na <sub>v</sub> _____	55
7.3. Participación de las subunidades $\beta$ en la capacidad invasiva y de migración de células CaSki _____	56
7.4. Participación de Na <sub>v</sub> 1.6 en la capacidad invasiva de células CaSki _____	59
<b>8. CONCLUSIONES _____</b>	<b>61</b>
<b>9. REFERENCIAS _____</b>	<b>62</b>

## 1. RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es el segundo tipo de cáncer más frecuente en mujeres alrededor del mundo. Anualmente se reportan casi medio millón de casos nuevos, de los cuales desafortunadamente alrededor de la mitad muere debido a esta enfermedad. En nuestro país una mujer muere de CaCu aproximadamente cada 2 horas. Ante este problema de salud, resulta imperante realizar estudios acerca de la biología de este carcinoma, en particular obtener información experimental sobre posibles marcadores moleculares que permitan una detección temprana y certera del CaCu, así como potenciales blancos moleculares para el tratamiento terapéutico del mismo.

Dentro de la gran variedad de genes cuya expresión se encuentra alterada en cáncer está la familia de los canales iónicos, proteínas integrales de la membrana, que en recientes estudios se ha demostrado su participación en diferentes aspectos distintivos del cáncer.

Nuestro laboratorio ha reportado recientemente que algunos de los canales de sodio activados por voltaje (canales  $\text{Na}_v$ ), concretamente el canal  $\text{Na}_v1.6$ , se encuentra sobre expresado tanto en biopsias como en cultivos primarios de CaCu en comparación con biopsias de cérvix no canceroso. La expresión del canal  $\text{Na}_v1.6$  es relevante para la progresión del CaCu, ya que al bloquear su actividad, la capacidad invasiva de las células de CaCu disminuye significativamente. Con el propósito de extender estos estudios a las líneas celulares de CaCu y contar con un modelo experimental de CaCu inagotable, en el presente proyecto se investigó la expresión de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los canales  $\text{Na}_v$  en 5 líneas celulares de CaCu: CaSki, SiHa, CaLo, HeLa e INBL. Los resultados mostraron que, contrario a lo esperado, las subunidades  $\alpha$  no están presentes en las líneas celulares de CaCu, ni a nivel de mensajero ni de manera funcional (ausencia de corrientes de sodio activadas por voltaje) en la membrana plasmática de dichas células. Interesantemente, el mRNA de las 4 subunidades  $\beta$  se detectó de manera evidente en todas las líneas celulares analizadas.



Con la finalidad de esclarecer la posible participación de algunos componentes del medio de cultivo en la regulación de la expresión de los canales  $Na_v$  en las líneas celulares de CaCu, se determinó el efecto del estradiol y del factor de crecimiento epidermal en células CaSki. Después de 24 y hasta 48 horas de incubación en presencia de los componentes mencionados, no se encontraron evidencias electrofisiológicas de canales  $Na_v$  en la membrana plasmática de las células tratadas. Estas observaciones sugieren que la presencia de estradiol o el factor de crecimiento epidermal en el medio de cultivo no regulan la expresión de los canales  $Na_v$ , y por lo tanto, no contribuyen a explicar la ausencia de canales  $Na_v$  funcionales en las líneas celulares de CaCu investigadas.

Independientemente de la ausencia de canales  $Na_v$  funcionales en las líneas celulares de CaCu, otro de los objetivos del presente trabajo consistió en analizar la participación de las subunidades  $\beta$  de dichos canales en la capacidad de migración y de invasividad de las células CaSki mediante ensayos funcionales *in vitro*. La disminución de la expresión de las subunidades  $Na_v\beta_1$  y  $Na_v\beta_2$  por medio de RNAs de interferencia (*siRNAs*), indujo una disminución significativa del 15 y 20% respectivamente, en la capacidad de migración en las células CaSki después de 24 horas de tratamiento con los *siRNAs*, aunque este efecto ya no fue significativo después de las 48 horas. Por el contrario, el mismo tratamiento con *siRNAs* provocó un aumento significativo (aproximadamente del 35%) en la capacidad invasiva de las células CaSki a las 48 horas de tratamiento; este efecto no fue significativo después de las primeras 24 horas de tratamiento. Estos resultados sugieren que las subunidades  $\beta$  de los canales  $Na_v$  contribuyen de manera significativa a la capacidad de migración y de invasividad, y que las rutas de señalización a través de las cuales influyen en uno y otro fenómeno son probablemente diferentes, ya que ocurren desfasados en el tiempo y con direcciones opuestas.

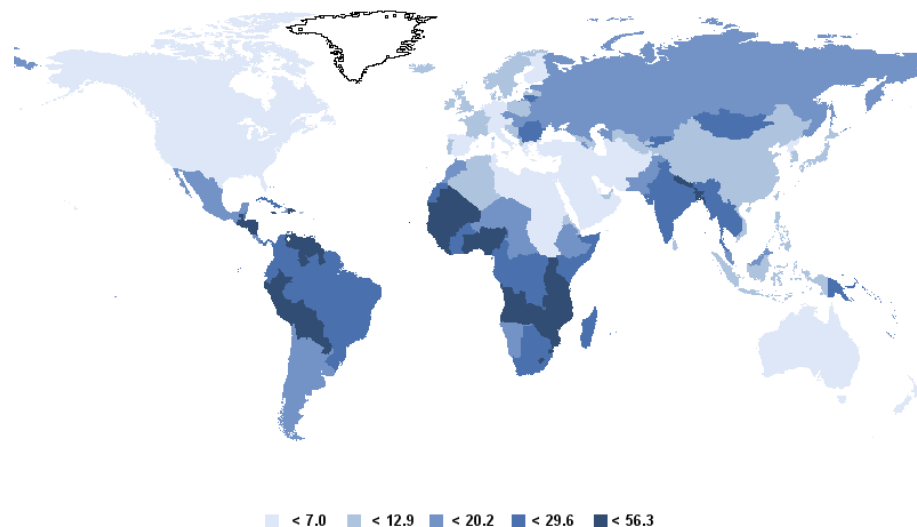
En conclusión, las subunidades  $\beta$  de los canales  $Na_v$  participan de manera importante tanto en la capacidad de migración como en la capacidad de invasividad de las células CaSki a través de un mecanismo que deberá estudiarse en futuras investigaciones.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Cáncer cervicouterino

El cáncer es un conjunto de enfermedades cuya característica en común es la pérdida del control homeostático, llevando a un aumento desregulado en la proliferación celular, invasión del tejido normal y capacidad de diseminación hacia tejidos secundarios. Las causas de este desbalance son principalmente factores ambientales que, a nivel molecular, resultan en la acumulación de mutaciones genéticas o aberraciones cromosómicas en una célula, confiriéndole ventajas por encima de las células normales (Caino et al., 2009; Gutschner & Diederichs, 2012). En la mayoría de los casos, si no es diagnosticado y tratado en etapas tempranas, el cáncer puede ser letal para el paciente.

En particular, el cáncer cervicouterino (CaCu) es un problema de salud de primer orden debido a que es el segundo tipo de cáncer más frecuente en mujeres a nivel mundial, precedido únicamente por el cáncer de mama. Cada año se presentan alrededor de medio millón de casos nuevos y más de 250,000 muertes debidas a esta enfermedad. El 88% de los casos que derivan en muerte ocurre en países en vías de desarrollo (Ferlay et al., 2010).



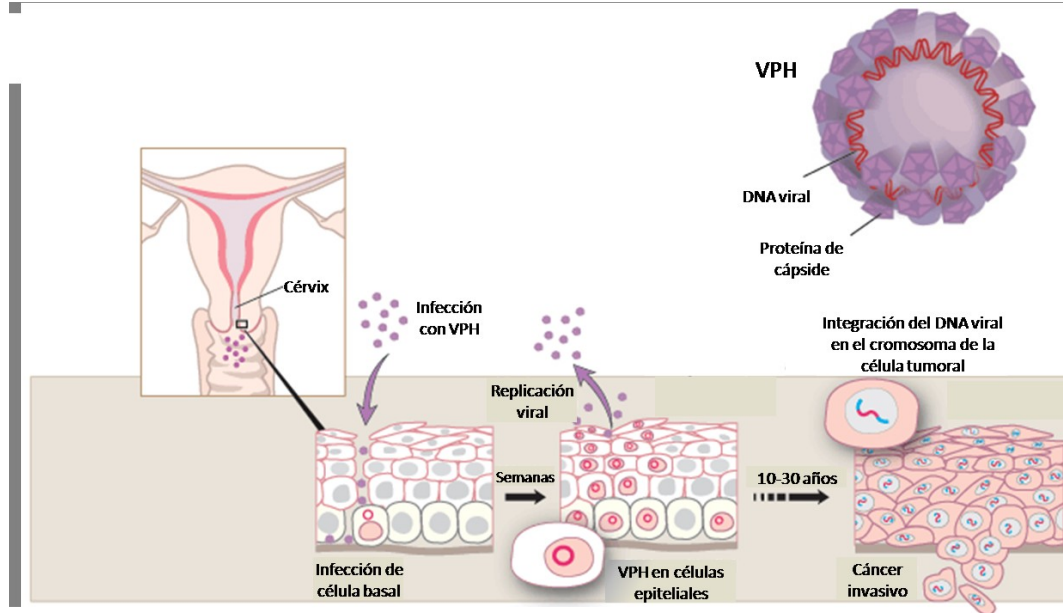
**Figura 1. Incidencia de cáncer cervicouterino en el mundo.** El código de colores indica el número de casos de CaCu por cada 100 mil habitantes. <http://globocan.iarc.fr/>

Actualmente se sabe que la infección persistente con el virus de papiloma humano (VPH) juega un papel decisivo en el desarrollo del CaCu ya que es necesaria, aunque no suficiente, para la generación de este cáncer. El DNA viral se encuentra presente en más del 99% de los casos de CaCu (Steben & Duarte-Franco, 2007; de Freitas et al., 2012).

El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae*, cuyos miembros se caracterizan por ser virus pequeños con DNA circular de doble cadena capaces de infectar el epitelio escamoso. Los VPH se clasifican por genotipo, específicamente por la secuencia que codifica a la proteína estructural L1, la cual forma la cápside viral. De esta manera se conocen alrededor de 130 tipos de VPH, de los cuales cerca de 40 son capaces de infectar el tracto genital, y dos de ellos, el tipo 16 y el tipo 18 (VPH-16 y VPH-18), son los responsables de aproximadamente el 70% de los casos de CaCu, por lo que encabezan el grupo denominado como VPH de alto riesgo (Horvath et al., 2010; Stanley, 2010).

La transmisión del VPH se produce principalmente por contacto piel con piel o mucosa con mucosa, siendo el contacto sexual la primera causa de infección, generando alrededor de 300 millones de nuevas infecciones cada año (Villa, 2011). Aunque se estima que la mayoría de las mujeres sufre una infección con VPH en algún momento de su vida, en la mayoría de los casos se logra erradicar la enfermedad de forma natural, sin embargo una minoría de las mujeres (entre 10 y 15%) no logra eliminar el virus por completo, lo que lleva a la infección persistente con alto riesgo de desarrollar cáncer (Stanley, 2010).

El CaCu surge a partir de una vía de cuatro pasos: transmisión del VPH, persistencia viral, progresión de una clona con infección persistente a precáncer, e invasión a través de la membrana basal del epitelio. El VPH infecta a las células basales pasando a través de micro abrasiones en el epitelio cervical y comienza a replicar su genoma dentro de la célula de forma episomal. La progresión a cáncer invasivo está asociada a la integración del DNA viral al genoma del hospedero (Fig. 2) (Woodman et al., 2007; Schiffman et al., 2007).



**Figura 2. Generación de CaCu mediado por VPH.** El virus del papiloma humano llega a las capas basales a través de micro lesiones en el epitelio cervical. Posterior a la infección, los genes de expresión temprana se expresan y el genoma viral se replica en forma episomal (núcleos rojos). En la zona media y la zona superficial el genoma viral se replica de forma más abundante y se expresan las proteínas de expresión tardía que forman la cápside viral, generando viriones que son liberados y que pueden infectar otras células. Algunas infecciones con VPH no son erradicadas y se convierten en infecciones persistentes. La progresión a cáncer invasivo está asociada con la integración del genoma viral dentro del genoma del hospedero (núcleos azules). Tomada de <http://www.oncohealthcorp.com/technology.html>

En el desarrollo del cáncer suceden cambios importantes en la célula que llevan a la expresión genética diferencial con respecto al tejido normal del cual provino, confiriéndole las características propias de la enfermedad. Entre la gran variedad de genes cuya expresión está alterada se encuentra la familia de los canales iónicos, que en recientes estudios han demostrado su participación en diferentes características de varios tipos de cáncer (Prevarskaya et al., 2010). Para los fines del presente trabajo de investigación, nos enfocaremos en uno de los miembros de la familia de canales iónicos: los canales de sodio activados por voltaje. Para un mayor entendimiento del tema, en los siguientes párrafos se describen las particularidades de estos canales y su relación con la biología del cáncer.

## **2.2. Canales iónicos activados por voltaje**

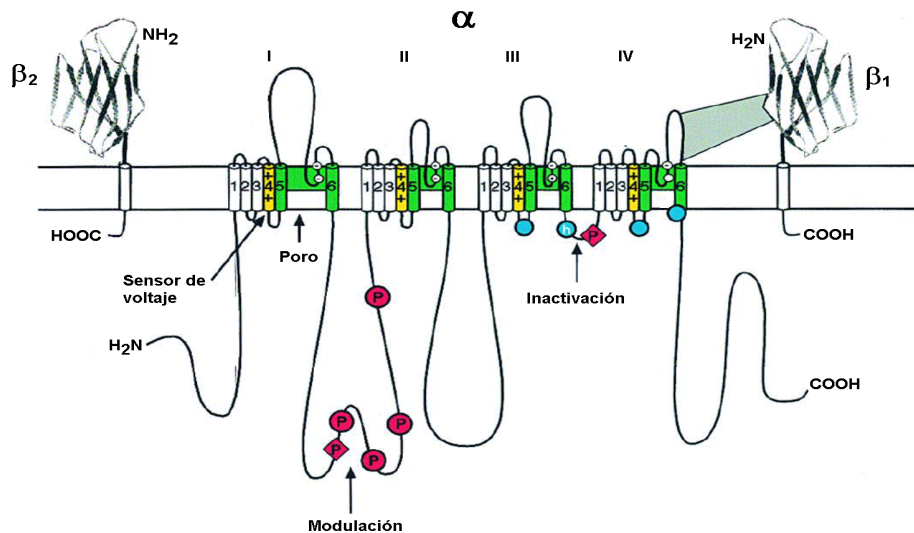
Los canales iónicos activados por voltaje (CIAV) son proteínas integrales de membrana que permiten el paso selectivo de iones inorgánicos a través de la membrana celular siguiendo un gradiente electroquímico. La superfamilia de CIAV comprende a los canales que transportan de manera selectiva sodio, potasio, calcio y cloruro en respuesta a cambios de voltaje en el potencial de membrana de las células; todos ellos comparten características funcionales y estructurales. En términos generales, están compuestos por una subunidad principal llamada  $\alpha$ , la cual contiene varios dominios transmembranales y que forma un poro acuoso por el que transitan los iones de un lado a otro de la membrana. En la mayoría de los casos esta proteína se encuentra asociada a otras subunidades, las cuales son nombradas subunidades auxiliares o accesorias. El flujo de iones a través de estos canales contribuye en gran medida al potencial de membrana, y está involucrado en la regulación del volumen celular, eventos de señalización intracelulares, contracción muscular, liberación de hormonas y neurotransmisores y regulación génica (Hille, 2001).

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

Los canales de sodio activados por voltaje (canales  $\text{Na}_v$ ) son responsables de la generación y propagación del potencial de acción en las células excitables, tales como neuronas, células musculares y células neuroendócrinas, aunque también se encuentran expresados en algunas células no excitables, en donde su papel fisiológico no ha sido completamente elucidado. Son complejos multiproteicos formados por una subunidad principal  $\alpha$  de aproximadamente 260 kDa (~2000 aminoácidos), asociada a una o dos subunidades auxiliares  $\beta$  de menor tamaño (alrededor de 35 kDa) (Catterall et al., 2005; Catterall, 2012).

La subunidad principal  $\alpha$  está organizada en cuatro dominios similares (I al IV), cada uno de los cuales está formado por seis segmentos transmembranales (S1 a S6) unidos por asas intra y extracelulares. Los segmentos S5 y S6 de cada dominio forman el poro del canal, y las asas que unen a dichos segmentos, denominadas asas del poro, forman el vestíbulo externo del canal y el filtro de selectividad. El asa intracelular que une a los dominios III y IV funciona como puerta de

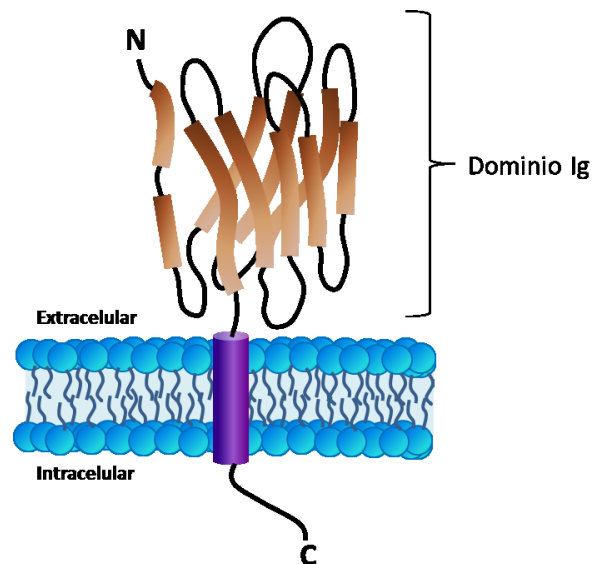
inactivación al plegarse dentro de la estructura del canal y bloqueando el poro del canal desde la parte interna. El sensor de voltaje del canal está formado por el segmento S4 de cada dominio, el cual contiene residuos cargados positivamente cada tres aminoácidos y que se mueven como respuesta a la despolarización de la membrana activando al canal (Fig. 3) (Payandeh et al., 2011; Payandeh et al., 2012).



**Figura 3. Representación esquemática de los canales de sodio activados por voltaje.** Se muestran los cuatro dominios (I al IV) que forman la subunidad principal  $\alpha$  de los canales  $\text{Na}_v$ , cada uno de ellos con seis segmentos transmembranales (1 - 6). Los segmentos S5 y S6 de cada dominio forman el poro del canal, mientras que los segmentos S4 conforman el sensor de voltaje. El asa que une los dominios I y II contiene varios sitios de fosforilación (P), y el asa III-IV es la responsable de la inactivación del canal. También se esquematizan dos subunidades auxiliares  $\beta$  a los costados de la subunidad  $\alpha$  (Modificada de Catterall, 2012).

Hasta el momento se han encontrado y caracterizado nueve diferentes subunidades  $\alpha$  cuya nomenclatura va de  $\text{Na}_v1.1$  a  $\text{Na}_v1.9$ ; ellas comparten más del 50% de identidad en su secuencia de aminoácidos y se clasifican de acuerdo con la resistencia que presentan a ciertas toxinas tales como la tetrodotoxina (TTX), que impide el flujo de iones a través del canal bloqueando el poro de conducción desde la parte extracelular. De esta manera existen dos grandes grupos de canales  $\text{Na}_v$ : aquellos sensibles a la TTX, cuyas corrientes de sodio son abatidas con concentraciones en el orden nanomolar de la toxina ( $\text{Na}_v1.1$ ,  $\text{Na}_v1.2$ ,  $\text{Na}_v1.3$ ,  $\text{Na}_v1.4$ ,  $\text{Na}_v1.6$ , y  $\text{Na}_v1.7$ ); y los resistentes a la TTX, en los cuales se requiere una concentración en el orden micromolar de la toxina para poder bloquear las corrientes de sodio a través de ellos ( $\text{Na}_v1.5$ ,  $\text{Na}_v1.8$  y  $\text{Na}_v1.9$ ) (Yu & Catterall, 2003).

Las subunidades accesorias  $\beta$  son proteínas transmembranales con un extremo amino extracelular, un solo segmento transmembranal y un extremo carboxilo intracelular. El dominio extracelular es estructuralmente similar al de la superfamilia de las inmunoglobulinas (dominio Ig), entre las cuales se encuentran las moléculas de adhesión celular tales como la contactina, y cuyo plegamiento característico consiste en la asociación entre diversas láminas beta antiparalelas (Fig. 4) (Isom, 2001). A la fecha se conocen cuatro de estas subunidades:  $\text{Na}_v\beta_1$ ,  $\text{Na}_v\beta_2$ ,  $\text{Na}_v\beta_3$  y  $\text{Na}_v\beta_4$ , así como una variante ( $\text{Na}_v\beta_{1b}$ ) que se genera por procesamiento alternativo del gen de  $\text{Na}_v\beta_1$  (Isom et al., 1992; Kazen-Gillespie et al., 2000; Morgan et al., 2000; Yu et al., 2003; Qin et al., 2003). Las subunidades  $\text{Na}_v\beta_1$  y  $\text{Na}_v\beta_3$  son sustancialmente similares en su secuencia (alrededor de 45% de identidad) y ambas se asocian de forma no covalente a la subunidad  $\alpha$ . Por otro lado,  $\text{Na}_v\beta_2$  y  $\text{Na}_v\beta_4$  están relacionadas entre sí con aproximadamente un 35% de identidad en su secuencia de aminoácidos, y se asocian de forma covalente con la subunidad  $\alpha$  mediante puentes disulfuro (Hanlon & Wallace, 2002; Yu et al., 2003).



**Figura 4. Representación esquemática de la subunidad  $\beta$  de los canales de sodio activados por voltaje.** Se esquematiza la estructura general de las subunidades  $\beta$  de los canales  $\text{Na}_v$ , las cuales contienen un solo segmento transmembranal, un extremo carboxilo en la región intracelular y un prominente dominio inmunoglobulina (Ig) extracelular.

El papel clásico (tradicional) de las subunidades  $\beta$  consiste en modular las propiedades biofísicas de la subunidad  $\alpha$  de los canales  $\text{Na}_v$ , principalmente la dependencia al voltaje de la activación, el curso temporal de la inactivación y la amplitud de la corriente (Isom, 2001; Brackenbury & Isom,

2011). Las subunidades  $\beta$  de los canales  $\text{Na}_v$  son tradicionalmente llamadas “auxiliares”; sin embargo, evidencias recientes sugieren que las subunidades  $\beta$  están lejos de ser únicamente “auxiliares”, de hecho se propone que juegan un papel de moléculas de señalización por si solas, y quizás incluso de manera independiente de la presencia de las subunidades  $\alpha$  (para una revisión véase Brackenbury & Isom, 2011).

### **2.3. Canales iónicos en el cáncer**

Actualmente se sabe que los canales iónicos están involucrados en numerosos procesos celulares, incluyendo algunos relacionados con el desarrollo y progresión de diversas patologías, entre las que se encuentra el cáncer. El concepto de la participación de los canales iónicos en la progresión del cáncer surgió a finales de la década de 1980, cuando se encontró que el uso de bloqueadores de canales de calcio y potasio produce una inhibición en la proliferación celular y un aumento en la apoptosis *in vitro*. Desde entonces se ha realizado una enorme cantidad de investigaciones al respecto, y hoy en día existe un número importante de reportes en los cuales se relaciona la expresión funcional de ciertos canales iónicos en los procesos característicos del cáncer tales como proliferación, evasión de la apoptosis, angiogénesis sostenida, migración e invasividad (Prevarskaya et al., 2010). A continuación se mencionan algunos ejemplos de la participación de los canales iónicos en el cáncer.

#### **2.3.1. Canales de potasio**

Diferentes tipos de canales de potasio desempeñan un papel importante en la biología del cáncer. Los canales  $\text{K}_v1.5$ ,  $\text{K}_v3.4$  y  $\text{K}_v10.1$ , activados por voltaje, inducen la proliferación celular en el cáncer de colon posiblemente a través de la regulación del pH intracelular o la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Ousingsawat et al., 2008). Por su parte, el canal  $\text{K}_v1.1$  y el canal activado por calcio  $\text{K}_{Ca}3.1$  también han sido relacionados con la proliferación, en este caso en el cáncer de mama y en melanoma, donde se sabe que estos canales juegan un papel importante en la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular (Oquadid-Ahidouch et al., 2000).



En otros trabajos se ha encontrado que el canal de potasio ether a-go-go (*EAG*) se encuentra presente en alrededor de 80% de los tumores humanos de diversos orígenes, mientras que de forma natural su expresión es exclusiva en tejidos de origen neural. Al inhibir su expresión se produce una disminución en la proliferación celular (Farias et al., 2004; Pardo et al., 2005). Asimismo se han encontrado evidencias de la actividad diferencial de canales de potasio activados por voltaje en líneas celulares de cáncer de próstata de acuerdo a su capacidad metastásica. De esta manera se reportó que la densidad de corriente generada por estos canales es mayor en las células con baja capacidad metastásica en comparación con aquellas de alto potencial metastásico (Laniado et al., 2001).

### **2.3.2. Canales de calcio**

Debido a que el calcio participa en muchos procesos celulares y en diversas cascadas de señalización, la regulación de la entrada de este ion a la célula es de suma importancia. Entre los procesos celulares en los cuales participa el ion calcio están la proliferación, contracción, secreción, neurotransmisión, apoptosis y la expresión genética en muchos tipos de células (Catterall, 2011). Los canales de calcio también se expresan en una amplia variedad de tipos de cáncer. Por ejemplo, mediante experimentos de RT-PCR se encontró que los canales de calcio tipo P y tipo L se encuentran expresados en carcinomas de células pequeñas de pulmón (Oguro-Okano et al., 1992). Los canales de calcio tipo L, en específico el canal  $Ca_v1.2$  se expresan y se distribuyen dentro de las células de forma diferencial en el cáncer de colon en comparación con el tejido no canceroso, siendo mayor la expresión de esta proteína cuando las células tienen un fenotipo canceroso, y distribuyéndose de forma perinuclear, mientras que en el tejido normal el canal se localiza en la membrana apical (Wang et al., 2000).

Los canales de calcio tipo T (también conocidos como de bajo umbral de activación o  $Ca_v3$ ) también han sido involucrados en varios tipos de cáncer. Por ejemplo, en el cáncer de próstata se ha encontrado por RT-PCR en tiempo real que existe una sobre expresión del mensajero del canal  $Ca_v3.2$  en la línea celular LNCaP durante su diferenciación neuroendocrina (Mariot et al., 2002) y el bloqueo de estos canales produce una disminución de la proliferación celular y un aumento en

la apoptosis en líneas celulares de cáncer de mama (Taylor et al., 2008a; Taylor et al., 2008b). Asimismo, en algunos carcinomas de esófago se encontró que la inhibición de la expresión, así como de la actividad funcional de los canales  $Ca_v3$ , produjo una disminución de la proliferación celular mediante un mecanismo que involucra la sobre expresión del gen supresor de tumores p53 y de la proteína de arresto del ciclo celular p21 (Lu et al., 2008).

### **2.3.3. Canales de sodio**

La presencia y actividad de los canales de sodio han sido relacionadas con la capacidad metastásica en diferentes tipos de cáncer. En el cáncer de mama, por ejemplo, la línea celular altamente metastásica MDA-MB-231 presenta corrientes de sodio activadas por voltaje, mientras que las células MCF-7 de bajo potencial metastásico no expresan estas corrientes (Roger et al., 2003). Al analizar la expresión génica de los canales  $Na_v$  en estas células, se encontró que el canal responsable de la generación de las corrientes de sodio es el canal  $Na_v1.5$ , y que éste se encuentra en su variante neonatal. Al inhibir la actividad de los canales con TTX, la capacidad invasiva de las células MDA-MB-231 se reduce significativamente (Fraser et al., 2005). Por otro lado, en el cáncer de próstata (el segundo tipo de cáncer más frecuente en hombres a nivel mundial) se ha reportado que las líneas celulares de alto potencial metastásico, tanto de humano como de rata, expresan de forma funcional el canal  $Na_v1.7$ , y no así las líneas celulares de bajo potencial metastásico. De igual manera en este caso, el bloqueo de los canales con TTX produce una disminución en la capacidad invasiva de las células que expresan corrientes de sodio, mientras que el tratamiento con TTX no afecta la capacidad invasiva en aquellas células que no presentan corrientes (Grimes et al., 1995; Laniado et al., 1997; Smith et al., 1998).

La actividad de los canales de sodio también juega un papel en la galvanotaxis (capacidad de las células de moverse de forma direccional como respuesta a un campo eléctrico) de la línea invasiva Mat-Ly-Lu de cáncer de próstata originario de rata. Al ser tratadas con TTX, las células dejan de migrar hacia el cátodo como lo harían en condiciones normales (Mycielska & Djamgoz, 2004). Otros tipos de cáncer en los cuales se ha observado la participación de los canales de

sodio activados por voltaje en la capacidad invasiva son el de ovario, el de colon y el de cuello uterino (House et al., 2010; Gao et al., 2010; Hernandez-Plata et al., 2012).

Aunque algunas hipótesis han sido planteadas, hasta el momento se desconoce el mecanismo preciso por el cual los canales de sodio contribuyen a la capacidad invasiva en estos tipos de cáncer. Una de estas hipótesis sugiere que la entrada de sodio produce un incremento en el calcio intracelular (probablemente mediante la función inversa del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plásmica), lo cual puede inducir, entre otras cosas, la liberación de metaloproteinasas, las cuales han sido reconocidas por su crucial papel en la progresión de los tumores cancerosos y la metástasis (Moss et al., 2012). Otra hipótesis plantea que la entrada de sodio a la célula induce la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  alcalinizando el pH intracelular y acidificando el ambiente extracelular adyacente a la membrana plasmática, lo que favorecería la degradación de la matriz extracelular y la invasividad celular, proceso en el que se propuso la actividad proteolítica de catepsinas B y S (Gillet et al., 2008; Brisson et al., 2011). Una tercera hipótesis plantea la regulación directa de la expresión génica mediante la actividad de los canales  $\text{Na}_v$  (Mycielska et al., 2005; Brackenbury & Djamgoz, 2006). Resulta evidente que se requiere realizar más estudios para determinar si los mecanismos descritos arriba son aplicables en todos los tipos de cáncer donde los canales  $\text{Na}_v$  son expresados o si diferentes canales  $\text{Na}_v$  realizan funciones distintas dependiendo del tipo de cáncer.

Más recientemente se ha reportado que las subunidades  $\beta$  de los canales  $\text{Na}_v$  desempeñan un papel importante en la capacidad invasiva en líneas celulares de cáncer de próstata y de mama. En el primer caso, se ha reportado que las cuatro subunidades  $\beta$  se encuentran sobreexpresadas (particularmente  $\text{Na}_v\beta 1$ ) en líneas celulares de cáncer de próstata altamente metastásicas con respecto a aquellas con baja capacidad invasiva. Esto sugiere que  $\text{Na}_v\beta 1$  interactúa con la subunidad  $\text{Na}_v 1.7$  (también sobre expresada en estas líneas celulares) incrementando su actividad y potenciando con ello la capacidad invasiva (Diss et al., 2008). Por otro lado, al favorecer la expresión de la subunidad  $\text{Na}_v\beta 2$  en células LNCaP de cáncer de próstata, la capacidad de migración, invasividad y proliferación *in vitro* aumenta significativamente, sin

embargo los estudios *in vivo* con ratones demuestran que la formación de tumores es más lenta cuando se inyectan células LNCaP que sobre expresan esta subunidad (Jansson et al., 2012).

En lo que se refiere a la participación de las subunidades  $\beta$  en cáncer de mama, se ha visto que la subunidad  $\text{Na}_v\beta 1$  se expresa alrededor de tres veces más en células MCF-7 con bajo potencial metastásico en comparación con la línea celular MDA-MB-231 altamente metastásica, tanto a nivel de mensajero como de proteína. En este caso se ha propuesto que  $\text{Na}_v\beta 1$  funciona como molécula de adhesión, aumentando la agregación celular y disminuyendo la movilidad de las mismas (Chioni et al., 2009).

#### **2.4. Canales iónicos en CaCu**

En cuanto al cáncer cervicouterino, existen algunos trabajos que relacionan la presencia de ciertos canales iónicos con determinadas características del fenotipo canceroso. En 2004, el grupo del Dr. Javier Camacho Arroyo del Cinvestav-IPN reportó la presencia de corrientes de potasio debidas a la actividad del canal de potasio tipo *EAG* y la abundante presencia del mensajero en células de cultivos primarios provenientes de biopsias de CaCu positivo para VPH-16 (Farias et al., 2004).

Otro grupo de trabajo reportó que el bloqueo de las corrientes de los canales de potasio dependientes de voltaje con tetraetilamonio, inhibió la proliferación celular de la línea celular SiHa (de CaCu positivo a VPH-16) (Han et al., 2006). Por su parte, Mao y colaboradores, reportaron que los canales de cloruro activados por volumen contribuyen a la migración dependiente del ciclo celular en células HeLa (de CaCu positivo a VPH-18), ya que la inhibición de la corriente transportada por estos canales provocó una disminución en la migración celular (Mao et al., 2009).

#### **2.5. Papel del estradiol en el CaCu**

El estradiol es una hormona sexual femenina del grupo de los estrógenos que es sintetizada en los ovarios y que participa en el desarrollo sexual de la mujer. Entre otras cosas, esta hormona

estimula la secreción del moco uterino y el engrosamiento del endometrio, la membrana que reviste internamente el útero. El mecanismo de acción se lleva a cabo a través de la unión del estradiol a un factor de transcripción específico denominado receptor de estrógenos (ER), localizado en el citoplasma y en el núcleo celular, y el cual al unirse a su ligando, forma dímeros que a su vez regulan la transcripción de genes blanco para esta hormona. Actualmente se han identificado dos receptores de estrógenos conocidos como ER $\alpha$  y ER $\beta$ , los cuales forman homodímeros o heterodímeros una vez que se han unido a su ligando (Nilsson & Gustafsson, 2011).

Es ampliamente reconocido que algunos tipos de cáncer, como el de mama y el de próstata, se desarrollan de forma dependiente de hormonas (Nilsson & Gustafsson, 2011). En el caso del CaCu, numerosos análisis estadísticos relacionan el uso prolongado de anticonceptivos hormonales con la susceptibilidad a desarrollar este tipo de cáncer, aunque aún se desconoce el mecanismo exacto por el cual se produce este efecto (Moreno et al., 2002; Munoz et al., 2002; Castro Romero et al., 2011). Una de las evidencias más importantes de que el estradiol contribuye a la carcinogénesis cervical proviene de estudios que se han realizado en ratones transgénicos que tienen los oncogenes E6 y E7 del VPH cuya expresión se encuentra bajo el control del promotor de transcripción de la queratina 14, lo cual dirige la expresión al epitelio escamoso. Estos ratones rara vez generan cáncer cervicouterino de forma espontánea, sin embargo, si se les somete a un tratamiento con estradiol, todos ellos generan CaCu en un lapso muy corto de tiempo (Brake & Lambert, 2005).

Asimismo, estudios realizados en líneas celulares de CaCu han demostrado que el tratamiento con estradiol aumenta la proliferación de las células SiHa (Ruutu et al., 2006), mientras que el tratamiento con bloqueadores de los receptores a estrógenos induce la muerte celular en células CaSki (línea celular de CaCu positiva a VPH-16) de forma dosis dependiente (Heo et al., 2008). Sin embargo, también existen reportes que indican que líneas celulares tales como HeLa, CaSki y SiHa no sólo no expresan el receptor de estrógenos  $\alpha$ , sino que la pérdida de la expresión de este receptor potencia el carácter invasivo de estas células (Zhai et al., 2010). No obstante que existen reportes mostrando una regulación positiva (incremento) de canales Na $v$  en cáncer de mama

(Fraser et al., 2010), así como una disminución de la expresión de canales de potasio *EAG* en líneas celulares de CaCu al exponerlas al estradiol (Diaz et al., 2009), el efecto de esta hormona en la expresión o actividad de los canales  $\text{Na}_v$  en CaCu no se ha estudiado todavía.

## **2.6. Papel del factor de crecimiento epidermal en el cáncer**

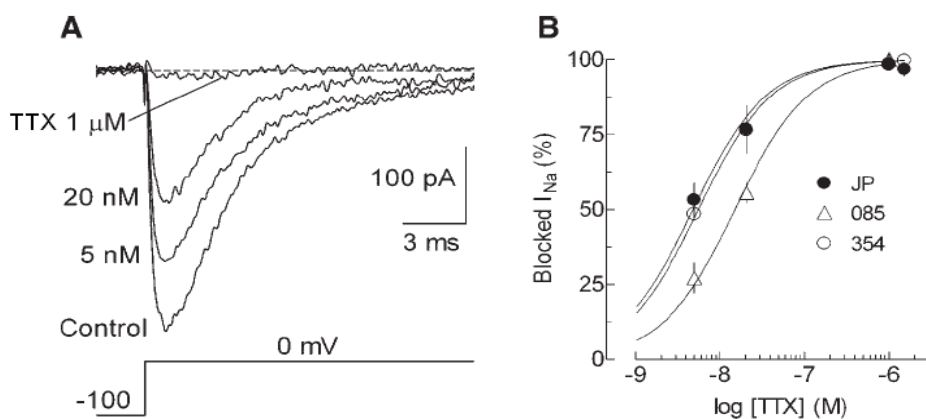
La progresión y crecimiento de las células cancerosas (y de las células en general) dependen en gran parte de la actividad de diversos receptores membranales acoplados a vías de señalización ligadas a la regulación del ciclo celular, angiogénesis, adhesión y migración. Uno de ellos es el receptor de factor de crecimiento epidermal (receptor a EGF), el cual ya se ha visto que desempeña un papel importante en el crecimiento y supervivencia de muchos tumores cancerígenos (Baselga & Albanell, 2002).

En el caso particular del cáncer cervicouterino, la expresión del receptor a EGF se ha visto asociada con el grado de neoplasia intraepitelial, pero independiente del tipo de VPH presente (Chapman et al., 1992; Soonthornthum et al., 2011). También se ha reportado que la proteína oncogénica E5 del VPH-16 es capaz de aumentar la activación del receptor a EGF a través de su unión a la subunidad c de la bomba  $\text{H}^+$ -ATPasa, lo que conduce a un decremento en la degradación de estos receptores y a un aumento en su expresión (Tsai & Chen, 2003; Zhang et al., 2005). No obstante, el mecanismo exacto por el cual se presenta este efecto no se ha dilucidado por completo.

Por otro lado, en líneas celulares de cáncer de próstata se ha visto que hay un incremento de aproximadamente el 30% en la expresión de canales  $\text{Na}_v$  al cultivar las células PC-3M en presencia de factor de crecimiento epidermal (50 y 100 ng/ml, durante 24 horas), y que, aunado a ello, se favorece al tráfico de los canales hacia la membrana celular (Uysal-Onganer & Djamgoz, 2007). Sin embargo, hasta el momento no se ha investigado la posible relación del factor de crecimiento epidermal en la expresión de canales  $\text{Na}_v$  en CaCu.

### 3. ANTECEDENTES DIRECTOS

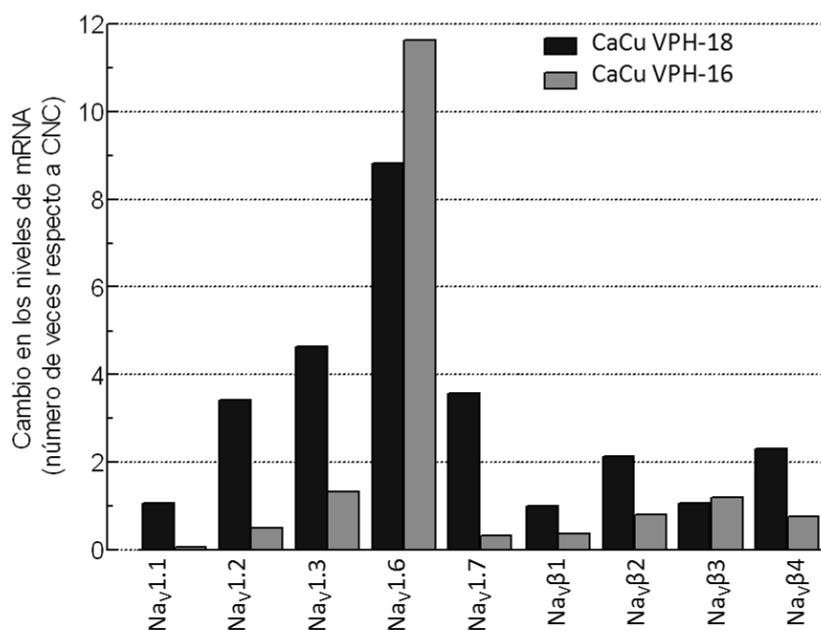
El primer reporte en el cual se evidencia la expresión de canales  $\text{Na}_v$  en el CaCu fue publicado por nuestro laboratorio, en donde se identificó, tanto a nivel molecular como electrofisiológico, la presencia de canales  $\text{Na}_v$  en cultivos primarios de CaCu positivos para el VPH-16. Estos cultivos primarios (nombrados JP, 085 y 354) expresaron corrientes de sodio activadas por voltaje, mismas que fueron inhibidas por completo con concentraciones de  $1 \mu\text{M}$  de TTX, lo cual indica que los canales  $\text{Na}_v$  responsables de estas corrientes pertenecen al grupo sensible a TTX (Fig. 5) (Diaz et al., 2007).



**Figura 5. Bloqueo con TTX de la corriente de sodio activada por voltaje de cultivos primarios de CaCu. A:** Trazos representativos de corrientes de sodio a 0 mV en presencia de las concentraciones indicadas de TTX en una célula del cultivo primario 085. Se observa que a una concentración de  $1 \mu\text{M}$  de la toxina se inhibe por completo la corriente de sodio. **B:** Curva dosis-respuesta para el bloqueo de la corriente de sodio en función de la concentración de TTX en los tres cultivos primarios de CaCu (Diaz et al., 2007).

Posteriormente se analizó la expresión diferencial del RNA mensajero (mRNA) de las subunidades  $\alpha$  que dan lugar a canales  $\text{Na}_v$  sensibles a TTX, así como las 4 subunidades  $\beta$  de estos canales con la técnica de RT-PCR en tiempo real (qPCR), tanto en los cultivos primarios JP, 085 y 354, como en biopsias de CaCu positivas para VPH-16. Los resultados mostraron que las células de cuello uterino (cancerosas y no cancerosas) expresan el mensajero de las subunidades  $\text{Na}_v1.1$ ,  $\text{Na}_v1.2$ ,

Nav1.3, Nav1.6 y Nav1.7, sin embargo, el mensajero del canal Nav1.6 se expresa ~ 40 veces más en el CaCu que en las células de cérvix no canceroso (Hernandez-Plata et al., 2012). Asimismo, en mi trabajo de tesis de licenciatura realicé el análisis de la expresión del mRNA de los canales Nav sensibles a TTX con la técnica de RT-PCR tiempo real en biopsias de CaCu generado por el segundo tipo de VPH más común en los casos de cáncer: el VPH tipo 18. Los resultados muestran que también existe una sobre expresión del mensajero del canal Nav1.6 en el CaCu en comparación con los controles de cérvix no canceroso (Fig. 6) (Sánchez-Sandoval, 2011). Estos resultados permiten proponer al canal Nav1.6 como un marcador molecular del CaCu ya que se encuentra sobre expresado en aproximadamente el 70% de todos los casos de CaCu estudiados.

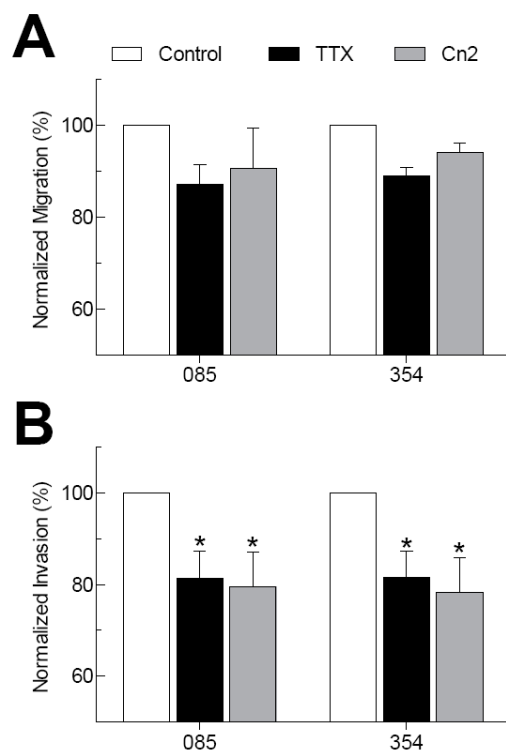


**Figura 6. Cambios en los niveles de mRNA de los canales Nav en CaCu generado por VPH-16 y 18.** Se muestra el cambio en los niveles de mRNA de los canales Nav en biopsias de CaCu generado por VPH-18 (barras negras) y VPH-16 (barras grises). La subunidad más sobre expresada en ambos casos es Nav1.6. CNC: cérvix no canceroso (Sánchez-Sandoval, 2011).

Otra contribución importante de los resultados de nuestro laboratorio, consistió en demostrar la participación de los canales Nav en las propiedades metastásicas del CaCu. Mediante ensayos funcionales de migración e invasividad utilizado los cultivos primarios de CaCu y bloqueando la actividad de los canales de sodio con la toxina TTX o con la toxina Cn2, la cual es selectiva para el



canal  $\text{Na}_v1.6$ , se obtuvo una disminución tanto en la migración como en la capacidad invasiva de los cultivos primarios (alrededor de 10 y 20%, respectivamente) al bloquear los canales  $\text{Na}_v$  con cualquiera de las dos toxinas; lo cual sugiere que la actividad de los canales  $\text{Na}_v$  en estas células podría estar favoreciendo su capacidad metastásica (Fig. 7). Aún más, el hecho de que el porcentaje de inhibición obtenido con ambas toxinas fue el mismo, sugiere fuertemente que el efecto sobre la invasividad de las células de CaCu está mediado principalmente por los canales  $\text{Na}_v1.6$ . Adicionalmente, la proteína del canal  $\text{Na}_v1.6$  se encontró expresada tanto en el tejido no canceroso como en los cortes de biopsias de CaCu, sin embargo, la localización fue claramente distinta en ambas preparaciones. En el tejido canceroso la señal del canal  $\text{Na}_v1.6$  se observó en toda la célula, mientras que en el tejido cervical no canceroso la señal se limitó a la membrana plasmática (Hernandez-Plata et al., 2012).



**Figura 7. Contribución de los canales  $\text{Na}_v$  en la invasividad *in vitro* de cultivos primarios de CaCu.** Migración (A) e invasividad (B) de los cultivos primarios 085 y 354 de CaCu en presencia de 6  $\mu\text{M}$  de TTX o 1  $\mu\text{M}$  de Cn2. Los datos fueron normalizados con respecto al control sin toxina y se presentan en forma de porcentaje (Hernandez-Plata et al., 2012).

A la luz de este conjunto de resultados sobre la relevancia de los canales  $\text{Na}_v1.6$  como marcador molecular del CaCu y su participación en la capacidad invasiva de este carcinoma, resulta interesante investigar si tales observaciones se presentan también en las líneas celulares derivadas de CaCu, las cuales representan un modelo alternativo para continuar estudiando la participación de los canales  $\text{Na}_v$  en la biología del CaCu. Debido en parte a que la disponibilidad de biopsias es más limitada, no cabe duda que la utilización de líneas celulares representa una fuente de muestras biológicas prácticamente inagotable. En este modelo experimental también se investigó el efecto de hormonas como el estradiol y del factor de crecimiento epidermal en la expresión de los canales  $\text{Na}_v$ . Adicionalmente, para extender los estudios de la importancia de los canales  $\text{Na}_v$  en las propiedades metastásicas del CaCu, el presente proyecto también se enfoca en determinar la participación de las subunidades  $\beta$  de los canales  $\text{Na}_v$  en dicho fenómeno celular.

## 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 4.1 Hipótesis

1. Las líneas celulares de CaCu expresan canales de sodio activados por voltaje funcionales, particularmente los canales  $Na_v1.6$ .
2. El estradiol y el factor de crecimiento epidermal regulan la expresión de los canales de sodio activados por voltaje en las líneas de cáncer cervicouterino.
3. Las subunidades de canales de sodio  $Na_v1.6$ ,  $Na_v\beta1$  y  $Na_v\beta2$  modulan la capacidad invasiva de las líneas celulares de CaCu.

### 4.2 Objetivo General

Investigar la participación de los canales de sodio activados por voltaje en las propiedades de migración e invasividad de líneas celulares de cáncer cervicouterino.

### 4.3 Objetivos Específicos

1. Identificar los mensajeros de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los canales  $Na_v$  en las líneas celulares de CaCu: CaSki, SiHa, CaLo, HeLa e INBL.
2. Determinar el efecto del estradiol y del factor de crecimiento epidermal en la expresión funcional de los canales  $Na_v$  en líneas celulares de CaCu.
3. Investigar el efecto de la sobre expresión del canal  $Na_v1.6$  en la migración e invasividad de las líneas celulares de CaCu.
4. Dilucidar la participación de las subunidades  $\beta$  de los canales  $Na_v$  en la capacidad de migración e invasividad de las líneas celulares de CaCu.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Cultivos celulares

Las líneas celulares de cáncer cervicouterino (Tabla 1) se crecieron y mantuvieron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; GIBCO-Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) suplementado con 1 mM piruvato de sodio, 25 mM HEPES, 10% de suero fetal bovino (SFB), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina, e incubadas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Los cultivos fueron renovados dos veces por semana de la siguiente manera. Cuando la monocapa de células alcanzó una confluencia entre 85 y 95%, el medio de cultivo fue retirado por aspiración con una pipeta Pasteur y las células se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS; en mM: 154 NaCl, 3 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 1.06 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2). El PBS se retiró y se agregó 1 ml de una solución balanceada de Hanks libre de calcio con 0.05% de tripsina y 0.53 mM de EDTA; después de 5 min de incubación, se adicionaron 9 ml de medio DMEM completo y las células se disociaron de manera mecánica utilizando pipetas serológicas de 10 ml. Las células se sembraron a una densidad 10 veces menor en una caja Petri nueva en un volumen final de 10 ml de medio DMEM completo. A partir de la misma suspensión celular se sembraron células para registro electrofisiológico y para ensayos funcionales. Para lo primero, una alícuota de 200 µl se sembró sobre fragmentos de cubreobjetos (0.7 x 0.7 cm) colocados en el fondo de una caja Petri de plástico de 35 mm, cuyo volumen final fue de 2 ml de DMEM completo. Estas células se mantuvieron en condiciones de incubación mínimamente 2 y no más de 18 h, antes de proceder a los registros electrofisiológicos. Respecto a los experimentos funcionales, éstos se detallan más adelante.

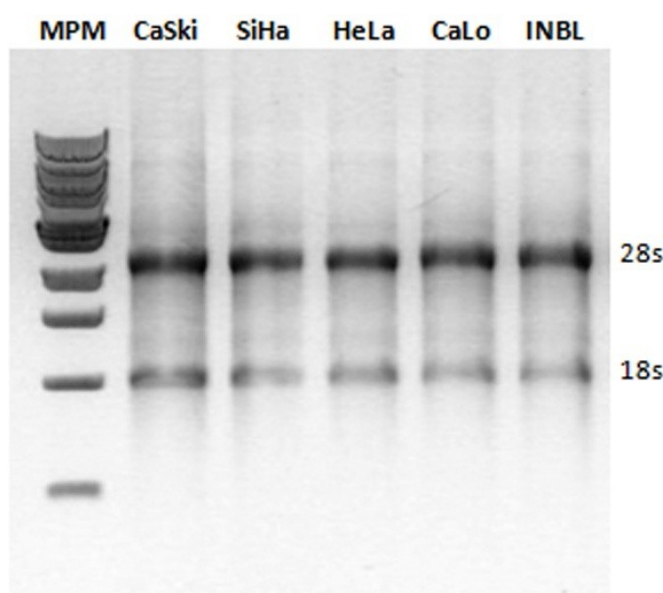
**Tabla 1. Información general de las líneas celulares de CaCu empleadas.**

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

\* American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA). \*\* (Caceres-Cortes et al., 2001) .

## 5.2. Extracción del RNA

La extracción del RNA total de las líneas celulares se realizó con el reactivo de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Con el fin de eliminar posible contaminación con DNA, las muestras de RNA fueron tratadas con *DNAse* I (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA) por 30 minutos a 37°C. En todos los casos, la concentración de los RNAs fue determinada con la ayuda de un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), y su integridad se evaluó por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (Fig. 8). Todas las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su uso posterior.



**Figura 8. Separación electroforética del RNA total extraído de las líneas celulares de CaCu.** Fotografía digital (en su forma negativa) de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. En cada carril se depositaron 0.5  $\mu$ g de RNA total de las líneas celulares de CaCu indicadas. Nótese la integridad de las dos fracciones de RNA ribosomales esperadas (28s y 18s). MPM: marcador de peso molecular de 1000 pares de bases.

## 5.3. RT-PCR estándar

La identificación del mensajero de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los canales  $Na_v$  en las líneas celulares de CaCu se realizó por medio de reacciones de transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa, es decir, RT-PCR estándar. Para ello se utilizó el kit *OneStep* (Invitrogen)

con oligonucleótidos (*primers*) específicos para dichas subunidades, así como para el gen constitutivo  $\beta$ -actina (Tabla 2). La mayoría de los *primers* fueron diseñados en nuestro laboratorio por medio del programa DNAsis Max (MiraiBio, Inc.; Alameda, CA, EUA), cuya especificidad ya ha sido corroborada (Diaz et al., 2007; Hernandez-Plata et al., 2012). Para detectar posible contaminación con DNA genómico, se incluyeron reacciones con *primers* comerciales para  $\beta$ -actina (Invitrogen) en las que se omitió la enzima transcriptasa inversa. Utilizando el mismo método se investigó también la presencia del mensajero de los receptores nucleares de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ) en las líneas celulares de CaCu, así como en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, las cuales sirvieron como controles positivo y negativo, respectivamente (Tabla 2). Los *primers* para estos receptores fueron proporcionados amablemente por la Dra. Elizabeth Langley del Instituto Nacional de Cancerología.

Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo en un termociclador programable de 96 pozos Veriti (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) en un volumen final de 25  $\mu$ l, conteniendo 500 ng de RNA total, 0.5  $\mu$ l de la mezcla de enzimas RT/*Platinum Taq*, 0.2-0.5  $\mu$ M de cada *primer* y 12.5  $\mu$ l de la mezcla de reacción 2X, que a su vez contiene 0.4 mM de dNTP y 2.4 mM de MgSO<sub>4</sub>. El ciclado térmico consistió en una primera etapa de 30 min a 50°C en la cual se realiza la síntesis del DNA complementario (cDNA), seguida de la desnaturalización a 94°C durante 2 min, y 40 ciclos de reacción, cada uno con los siguientes pasos: 15 s a 94°C, 30 s a la temperatura óptima de hibridación (Tabla 2), y 30 s a 72°C en donde se realiza la elongación. Al finalizar los 40 ciclos, se sometió a las muestras a una etapa final de elongación a 72°C durante 7 min.

La identidad de los productos de PCR obtenidos se comprobó mediante análisis con enzimas de restricción, cuyos fragmentos resultantes se visualizaron en geles de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio. En algunos casos, la identidad se obtuvo mediante secuenciación automática de los amplicones, previamente subclonados en un vector de secuenciación, como se describe en el siguiente apartado.

**Tabla 2. *Primers* empleados en las reacciones de RT-PCR estándar.**

mRNA	No. acceso en el <i>GenBank</i>	Secuencia de los <i>primers</i> (5' → 3')	Tamaño del amplificado (pb)	Temp. de hibridación	Control (+)
Na <sub>v</sub> 1.1	NM_006920	F: TGGCAGTGTTCAGCGAATGG R: GGCGAGTCCAAGTTCTACCAGG	656	64°C	JP
Na <sub>v</sub> 1.2	M94055	F: ACATCTGTGTGAAGGCTGGTAG R: CAGTAAGGACTGGTGTGGAGAA	629	65°C	JP
Na <sub>v</sub> 1.3	NM_006922	F: GGAGAGAGAGACAGCTTTCC R: CCAGAGGAATCCTCCAGCATC	551	63°C	IMR32
Na <sub>v</sub> 1.4	M81758	F: GCCGTTCAACGACACCAACAC R: TGCCAGCATCACTGCTGTTC	249	64°C	μ1
Na <sub>v</sub> 1.5	NM_198056	F: AGAAGATGGTCCCAGAGCAATG R: CTCGAAGCCATCTACACACGGA	466	62°C	JP
Na <sub>v</sub> 1.6	AF225988	F: AGGCCGATGGCAGTCATCG R: AAGCCTTTGGTGCCATTTTCAAG	784	65°C	IMR32
Na <sub>v</sub> 1.7	NM_002977	F: GACCCGTGGAAGTGGCTGGA R: CTTGCTCTTTTTAAGACGGTC	748	60°C	JP
Na <sub>v</sub> 1.8	NM_006514	F: GCATAGGGAGCAGAAGGACC R: GGAGATCTATTGCTGTGCCA	506	62°C	IMR32
Na <sub>v</sub> 1.9	NM_014139	F: GATGACGTTGAATTTTCTGGTGAAGATA R: CAAATCCGAAGGCTACCCATTTAGTA	574	62°C	IMR32
Na <sub>v</sub> β1	NM_001037	F: GAGACCGAGGCCGTGTATGGGATG R: GCCCAGGGCCAGGGCTATT	593	66°C	354
Na <sub>v</sub> β2	NM_004588	F: CTGAAGCTGGAGCGGTTTCAA R: CTTGCCCTCCTCCTCGGTCT	342	60°C	354
Na <sub>v</sub> β3	NM_018400	F: GGTCAGAAAGTCGCCCCCTG R: CTCGGGCCTGTAGAACCATTC	324	66°C	354
Na <sub>v</sub> β4	NM_174934	F: CACGCCACCATCTTCTCCAA R: TGCAGCTGCTCAGCCGAAG	284	65°C	354
ERα	NM_000125	F: GTGTACCTGGACAGCAGCAAG R: CACTCAACAGCGTGTCTCCG	192	60°C	MCF-7
ERβ	NM_001437	F: GTGGTCCATCGCCAGTTATC R: GTCCAGGTTCAAAGAGGGATG	169	60°C	MCF-7

Se proporcionan las secuencias de los *primers* sentido (F) y antisentido (R). Para cada par de *primers* se indica el mRNA blanco, el número de acceso en el *GenBank*, la longitud (en pares de bases) del cDNA esperado, la temperatura óptima de alineamiento, y el DNA que se utilizó como control positivo en cada caso: JP y 354, cultivos primarios de CaCu (Díaz et al., 2007) ; IMR32, línea celular de neuroblastoma; μ1, plásmido que contiene el DNA del canal Na<sub>v</sub>1.4; MCF-7, línea celular de cáncer de mama.

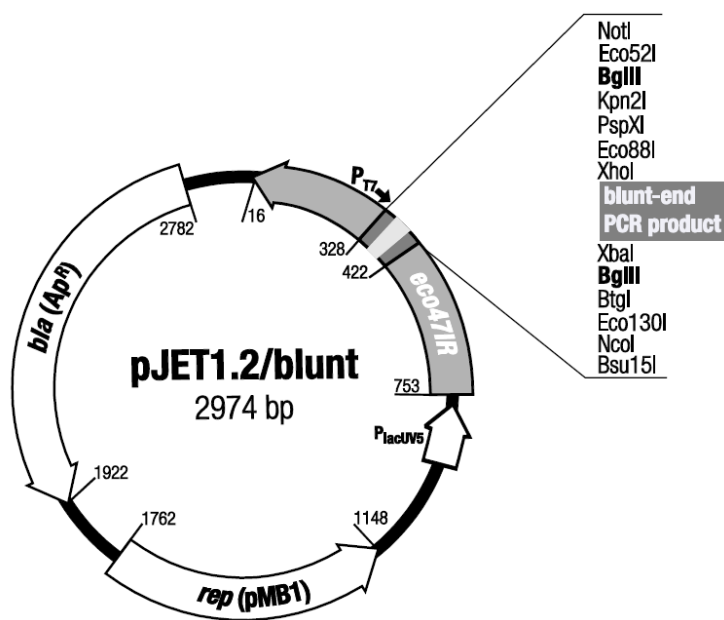
#### 5.4. Subclonación de productos de la RT-PCR estándar

Los productos amplificados en la reacción de RT-PCR para el receptor de estrógenos  $\alpha$  en las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231 y CaSki, así como el producto de la amplificación del receptor a estrógenos  $\beta$  de la línea celular INBL, fueron subclonados en el vector pJET1.2/blunt del kit *CloneJET PCR Cloning* (Fig. 9; Fermentas-Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) para ser secuenciados y de esta manera corroborar su identidad molecular. Las reacciones de ligación se llevaron a cabo a 22°C durante 30 min en tubos Eppendorf conteniendo 2  $\mu$ l de la reacción de RT-PCR, 10  $\mu$ l de Buffer de reacción 2X, 1  $\mu$ l de T4 DNA ligasa, 1  $\mu$ l de vector pJET1.2/blunt, y 6  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. Posteriormente, estas ligaciones se utilizaron para transformar bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$ . Debido a que el vector contiene el gen de resistencia para ampicilina, las bacterias transformadas fueron capaces de generar colonias en medio Luria-Bertani (LB) sólido en presencia de 100  $\mu$ g/ml de dicho antibiótico. De cada transformación se eligieron 7 colonias y se sembraron en medio LB líquido también con ampicilina con el fin de amplificar el plásmido de interés, se incubaron a 37°C en agitación constante (250 rpm) por un periodo de 16 horas y posterior a ello se procedió a la purificación del DNA plasmídico con el kit Qiaprep Spin MiniPrep de Qiagen (Hamburgo, Alemania). Un  $\mu$ l de cada plásmido purificado se digirió con la enzima *Bgl*III para liberar el fragmento de DNA ligado en el vector, y los productos de la digestión fueron visualizados en un gel de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio. De aquellos vectores en los cuales el fragmento liberado concordó con el tamaño esperado de acuerdo al producto de PCR, se eligieron algunos para secuenciarlos de manera automática en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular (IFC) utilizando el *primer* comercial T7, y así corroborar su identidad molecular.

#### 5.5. PCR en tiempo real

Las reacciones de PCR en tiempo real (qPCR) se llevaron a cabo utilizando pares de *primers* y sondas fluorescentes de la tecnología *TaqMan* y un termociclador *ABI Prism 7000 Sequence Detection System* acoplado a una computadora que contiene el programa *SDS 1.2.2* para la adquisición y análisis de resultados (Applied Biosystems), disponible en la Unidad de Biología Molecular del IFC.





**Figura 9. Vector pJET1.2/blunt.** Esquema del mapa del vector con el sitio de ligación del producto de PCR con extremos romos, al igual que los sitios de corte de diversas enzimas de restricción. El producto clonado puede ser liberado mediante la digestión con la enzima *BglII*. El vector contiene el gen de resistencia a ampicilina *bla*(Ap<sup>R</sup>), lo que permite seleccionar las colonias positivas.

Primeramente se llevó a cabo la síntesis de cDNA a partir de 3 µg de RNA total de las muestras de interés, utilizando el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). La mezcla de reacción incluyó además 2 µl de amortiguador 10X, 0.8 µl de dNTPs a una concentración de 100 mM, 2 µl de *random primers* (oligonucleótidos de secuencia aleatoria que permiten la transcripción inversa de cualquier molécula de RNA presente en la muestra), 1 µl de inhibidor de RNAsas y agua suficiente para obtener un volumen final de reacción de 20 µl. La síntesis del cDNA se realizó a 37°C por un periodo de dos horas, y posteriormente se adicionaron 20 µl de H<sub>2</sub>O. A éste se le denominó *cDNA stock*, a partir del cual se hicieron diluciones 1:4 que fueron almacenadas en forma de alícuotas a -20°C.

La amplificación del cDNA mediante qPCR se realizó por triplicado en un volumen final de 15 µl, conteniendo 3 µl de la dilución 1:4 de cDNA, 0.6 µl del ensayo (par de *primers* y sonda, Tabla 3), 3.9 µl de agua, y 7.5 µl de la mezcla *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems) que

contiene los componentes necesarios a las concentraciones adecuadas para llevar a cabo la reacción. Las reacciones se llevaron a cabo en placas de 96 pozos cubiertas con tapas plásticas adhesivas (Applied Biosystems) y aplicando un ciclado térmico que consistió en lo siguiente: 2 min a 50°C, donde se genera la activación enzimática, 10 min a 95°C para desnaturalizar el cDNA, y 45 ciclos que a su vez consistieron en 15 s a 95°C y 1 min a 60°C para promover el alineamiento y la elongación. Una vez finalizada la reacción de qPCR, con la ayuda del programa *SDS 1.2.2* se fijó un mismo umbral para todas las muestras en la fase geométrica de la reacción en la cual existe aproximadamente 100% de eficiencia. De esta manera, el programa proporcionó los valores de  $C_T$  (ciclo umbral) de cada una de las muestras en el umbral establecido, así como el promedio del triplicado de cada muestra con su respectiva desviación estándar.

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

mRNA	No. acceso en el <i>GenBank</i>	Secuencia de los <i>primers</i> (5' → 3')	Tamaño del amplificado (pb)	Eficiencia %
Na <sub>v</sub> β1	NM_001037	F: GGAGGATGAGCGCTTCGA R: CAGATCCTGCAGGTCTTTGGT P: AATGGCAGCCGGGG	70	97
Na <sub>v</sub> β2	NM_004588	F: TGCAGCCGGAGGATGAG R: GAGGACCTGCAGATGGATCTTG P: CCCCTGACCGCCACCG	92	100
Na <sub>v</sub> β3	NM_018400	F: CGCCAGCCCCAGAAGAT R: CACAGGGAAGCAGACACTGA P: TTTCCCTGGCTTCTC	90	96
Na <sub>v</sub> β4	NM_174934	F: AAGAAGTGGACAACACAGTGACA R: TGAGTTTCTTGATCAGCAGGATGAG P: CTGTCGTGGGCGGGGT	93	100

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

En los casos en que fue necesario, los cambios en la expresión relativa de los genes se analizaron por el método de  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Livak & Schmittgen, 2001), utilizando los valores de expresión de HPRT1 como gen constitutivo. Para ello se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Cambio en la expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

donde  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ problema}} - \Delta C_{T \text{ control}}$ , y  $\Delta C_{T \text{ problema}} = C_{T \text{ problema}} - C_{T \text{ gen endógeno}}$ , así como  $\Delta C_{T \text{ control}} = C_{T \text{ control}} - C_{T \text{ gen endógeno}}$ . Para la muestra control, el  $\Delta\Delta C_T$  es igual a cero, y por lo tanto  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  en estos casos es 1, por lo que el análisis de  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  en las muestras problema indica el número de veces de cambio en la expresión del gen de interés con respecto a la muestra control.

### 5.6. Actividad estrogénica nuclear en líneas celulares de CaCu

Para corroborar la presencia de receptores nucleares a estrógenos en las líneas celulares de CaCu estudiadas en el presente trabajo, se realizó un ensayo de actividad estrogénica nuclear. Para ello se utilizó el vector 3x ERE-Luc, que contiene tres elementos de respuesta a estrógenos y el gen reportero de luciferasa. Un elemento de respuesta a estrógenos es un sitio en el DNA al que se unen los receptores nucleares de estrógenos para promover la transcripción, y se trata de una repetición palindrómica invertida cuya mínima secuencia consenso es la siguiente: 5'-GGTCAnnnTGACC -3', donde  $n$  es cualquier nucleótido (Klein-Hitpass et al., 1988). De forma simultánea, se utilizó un vector para la expresión constitutiva de  $\beta$ -galactosidasa como control de transfección en una cantidad 20 veces menor a la del vector 3x ERE-Luc.

La transfección con ambos vectores se realizó por sextuplicado en placas de 24 pozos para cada línea celular con ayuda del reactivo Lipofectamine™ 2000 en medio Opti-MEM® reducido en suero (Invitrogen). Después de 24 horas del inicio de la transfección, la mitad de las células (tres pozos) se incubaron con 10 nM de  $\beta$ -estradiol y los tres pozos restantes con el vehículo únicamente (etanol). Al término de 24 horas de tratamiento, los cultivos fueron sometidos a lisis con un buffer conteniendo: 100 mM buffer de fosfato de potasio pH 7.8, 0.2% Tritón X-100 y 0.1 mM DTT, y finalmente procesados para detectar la actividad de luciferasa y de  $\beta$ -galactosidasa en un luminómetro LUMAT LB 9507 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemania). Para ello se tomaron 40  $\mu$ l del lisado celular y se agregaron 100  $\mu$ l de buffer de reacción de luciferasa (25 mM glicil-glicina pH 7.8, 15 mM  $MgCl_2$ , 5 mM ATP, pH 7.8 y 0.5 mg/ml BSA), posteriormente el luminómetro inyectó 35  $\mu$ l de luciferina 100 mM y realizó la lectura a 490 nm durante 20 segundos. Para la detección de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, a cada muestra se adicionó 100  $\mu$ l de buffer de reacción para  $\beta$ -galactosidasa (100 mM buffer de fosfato de sodio pH 8.0, 1 mM  $MgCl_2$  y 3X Galactón), se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 45 min, y

finalmente el luminómetro inyectó 100  $\mu$ l de solución aceleradora: 30% Tropix Emerald™ (Applied Biosystems) y 0.2 N NaOH; y 5 s después realizó la lectura a 542 nm durante un periodo de 5 s.

Como control positivo para este experimento, se utilizó a la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (ATCC), cuya actividad estrogénica nuclear ha sido bien caracterizada, además de que el tratamiento con  $\beta$ -estradiol induce un aumento significativo en la proliferación de dichas células (Weichselbaum et al., 1978). Los resultados de la actividad de luciferasa, la cual es proporcional a la actividad estrogénica nuclear, fueron normalizados con respecto a la actividad de  $\beta$ -galactosidasa para cada muestra, y los resultados finales se muestran como la respuesta al tratamiento con la hormona en cada línea celular, relativa a la respuesta generada en las células control (MCF-7). Los ensayos de actividad estrogénica nuclear se realizaron en colaboración con la Dra. Elizabeth Langley del Instituto Nacional de Cancerología, quien amablemente proporcionó los materiales y la asesoría para realizarlos.

### **5.7. Tratamiento con estrógenos**

Las células se crecieron en medio MEM (Minimum Essential Media; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) sin rojo de fenol y sin antibióticos, suplementado con 1 mM piruvato de sodio, 25 mM HEPES y 5% de SFB tratado con carbón-dextrán para eliminar estrógenos. Para constatar el efecto del tratamiento con estradiol se elaboró una curva de proliferación con las células MCF-7 de cáncer de mama. Para ello se sembró una cantidad conocida de células en cada uno de los 24 pozos de una placa multipozos a partir de una misma suspensión celular. Después de 24 horas se inició el tratamiento con 10 nM de  $\beta$ -estradiol en la mitad de los pozos, mientras que el resto permaneció con medio de cultivo sin estradiol. Cada 24 horas se cambió el medio a todos los pozos y se contó el número de células de cada condición por duplicado con la ayuda en una cámara de Neubauer.

El efecto del  $\beta$ -estradiol en la expresión de los canales  $\text{Na}_v$  se realizó en células CaSki al incubarlas en presencia de diferentes concentraciones de la hormona (1, 10, 50 y 100 nM) y con dos

tiempos diferentes de tratamiento (24 y 48 horas). Al término del tratamiento, las células se tripsinizaron y sembraron en cubreobjetos para realizar el registro electrofisiológico (véase más adelante) en busca de la generación de corrientes de sodio activadas por voltaje.

### **5.8. Tratamiento con factor de crecimiento epidermal**

En este caso las células fueron incubadas en medio DMEM con 1 mM piruvato de sodio, 25 mM HEPES, antibiótico/antimicótico y 1% de SFB inactivado por calor durante 30 min a 56°C con el fin de desnaturalizar proteínas tales como el EGF. El efecto del tratamiento con EGF se validó con una curva de proliferación de la línea celular CaSki, cuyo aumento en la proliferación en respuesta al tratamiento con 0.2 ng/mL de EGF ya ha sido reportado previamente (Castrilli et al., 1997). Brevemente, una cantidad conocida de células se sembró en cada uno de los pozos de una placa multipozos a partir de una misma suspensión celular. Después de 24 horas se inició el tratamiento con 0.2 ng/mL de EGF en la mitad de los pozos, mientras que el resto permaneció con medio de cultivo sin EGF. Cada 24 horas se cambió el medio a todos los pozos y se contó el número de células de cada condición por duplicado con una cámara de Neubauer.

De igual manera el efecto del EGF en la expresión de los canales  $Na_v$  se investigó en las células CaSki con 4 diferentes concentraciones de EGF: 0.2, 1, 10 y 50 ng/mL, y con dos diferentes tiempos de tratamiento (24 y 48 horas). Al término del tratamiento, las células se tripsinizaron y sembraron en cubreobjetos para realizar el registro electrofisiológico (véase el siguiente apartado).

### **5.9. Registros electrofisiológicos**

Las corrientes de sodio de las líneas celulares de CaCu fueron investigadas con la técnica de *patch clamp* en la configuración de célula completa (Hamill et al., 1981). Para tal fin se utilizó un amplificador Axopatch 200B, el cual estuvo conectado a una interfase Digidata 1320, y ésta a su vez a una computadora equipada con el software de pClamp 9.2 (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, EUA), con el cual se diseñaron y aplicaron los protocolos de voltaje necesarios

para estudiar las corrientes de sodio. Las micropipetas de registro se fabricaron a partir de capilares de vidrio con la ayuda de un estirador horizontal modelo P-97 (Sutter Instrument Co. Novato, CA, EUA), después las puntas de éstas se pulieron al calor con una microforja (MF-830, Narishigue Co. Japón). Para los registros se utilizaron micropipetas con resistencias de 3-4 M $\Omega$ , después de haber sido llenadas con una solución interna de registro cuya composición fue (en mM): 112 CsCl, 30 NaCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 EGTA, 10 HEPES y un pH 7.3 ajustado con CsOH. La solución externa contenida en la cámara de registro tuvo la siguiente composición (en mM): 158 NaCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES y un pH 7.4 ajustado con NaOH.

La realización de los registros electrofisiológicos implicó la obtención de un sello de alta resistencia  $\geq 1$  Giga ohmio (G $\Omega$ ) entre la membrana celular y la punta de la micropipeta (electrodo o pipeta de registro), a un potencial de mantenimiento (HP) de 0 mV; acto seguido se impuso un HP de -100 mV, y se rompió el parche de membrana localizado en la punta del electrodo de registro, lo que permitió dos cosas: una, el intercambio casi instantáneo del contenido intracelular por el de la solución contenida en la pipeta de registro; y dos, fijar el HP intracelular a conveniencia del experimentador. Finalmente se cancelaron de manera analógica las espigas de corriente capacitiva asociadas a la instalación y corte de pulsos breves hiperpolarizantes de 5 mV. Una vez cubiertas estas etapas se procedió a registrar las corrientes de sodio activadas por voltaje aplicando pulsos despolarizante a 0 mV durante 16 ms a partir de un potencial de mantenimiento a -100 mV. En algunas ocasiones también se aplicaron protocolos de voltaje denominados IV-16ms, los cuales exploraron la presencia de corrientes de sodio a potenciales de membrana entre -60 y +80 mV.

#### **5.10. Abatimiento de la expresión de subunidades $\beta$ de canales $\text{Na}_v$**

La expresión de las subunidades accesorias  $\text{Na}_v\beta 1$  y  $\text{Na}_v\beta 2$  de los canales  $\text{Na}_v$  de la línea celular CaSki fue disminuida mediante el empleo de RNAs de interferencia (o de silenciamiento) específicos para cada subunidad. Se trata de RNAs pequeños de doble cadena (*siRNAs*, por sus siglas en inglés) prediseñados, de 21 pares de bases, que fueron introducidos a las células usando el reactivo N-TER™ (Sigma-Aldrich). La eficiencia de silenciamiento de tres *siRNAs* diferentes para

cada subunidad  $\beta$  de interés fue evaluada por medio de qPCR después de utilizar diferentes concentraciones de *siRNAs* y diferentes tiempos de incubación. Posterior a ello se realizaron los ensayos de migración e invasividad correspondientes (véase apartado 7.13.).

**Tabla 4. Secuencia de los *siRNAs* empleados para abatir la expresión de subunidades  $\text{Na}_v\beta$ .**

mRNA blanco	<i>siRNA</i>	Secuencia de los <i>siRNAs</i> (5' → 3')
$\text{Na}_v\beta 1$	165	F: CCGAGUGGACCUUCCGCCA[dT][dT] R: UGGCGGAAGGUCCACUCGG[dT][dT]
	166	F: GCACUGAGGAGUUUGUCAA[dT][dT] R: UUGACAAACUCCUCAGUGC[dT][dT]
	210	F: CCGAGGCCGUGUAUGGGAU[dT][dT] R: AUCCCAUACACGGCCUCGG[dT][dT]
$\text{Na}_v\beta 2$	790	F: CAGUGAACCAACAGUU[dT][dT] R: AACUGUUUGUGGUUCACUG[dT][dT]
	791	F: GGUCAAGUGUGUGAGGAGA[dT][dT] R: UCUCUCACACACUUGACC[dT][dT]
	792	F: GCUACACAGUGAACCAAA[dT][dT] R: UUGUGGUUCACUGUGUAGC[dT][dT]

Se presenta el No. de identificación de cada *siRNA* y las secuencias de los mismos (F: sentido; y R: antisentido), así como el mRNA blanco que reconocen.

### 5.11. Inmunocitoquímica

Con el propósito de detectar la proteína de las subunidades  $\text{Na}_v\beta 1$  y  $\text{Na}_v\beta 2$  se realizaron experimentos de inmunocitoquímica en células CaSki ordinarias y transfectadas con *siRNAs* durante 24 o 48 horas. Las células fueron sembradas en cubreobjetos de 1 cm<sup>2</sup> y se mantuvieron durante cuatro horas en condiciones estándar de incubación a 37°C. Después, las células fueron fijadas con metanol absoluto durante 10 min a 4°C, permeabilizadas con una solución de tritón 0.2% en PBS 1X por un periodo de 10 min, e incubadas con una solución de SFB al 5% en PBS 1X durante una hora a 37°C, con la finalidad de bloquear todos los epítopos de la muestra y prevenir la unión inespecífica del anticuerpo. Posteriormente, las muestras se incubaron en presencia del anticuerpo primario, cabra-anti  $\text{Na}_v\beta 1$  o cabra-anti  $\text{Na}_v\beta 2$  (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), según fuera el caso, a una dilución 1:50 en PBS 1X suplementado con 1.5% de SFB en una cámara húmeda a 4°C durante 16 horas. La incubación con el anticuerpo secundario conejo-anti cabra *Alexa Fluor 647* (1:300; Invitrogen), se realizó de la misma manera por un periodo de 4

horas a 4°C. Acto seguido se montaron las muestras en portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia (Dako, Carpinteria, Ca, EUA) y fijados con barniz de uñas, para su posterior observación en un microscopio de epifluorescencia Olympus IX71 (Center Valley, PA, EUA). Las microfotografías fueron adquiridas con una cámara Evolution VF Color Cooled (Media Cybernetics; Rockville, MD, EUA). En todos los casos se realizaron controles negativos omitiendo el anticuerpo primario de las tinciones.

### **5.12. Transfección del canal Na<sub>v</sub>1.6**

El plásmido que contiene la secuencia completa del canal Na<sub>v</sub>1.6 de rata fue amablemente donado por el doctor Edward Pérez Reyes, de la Universidad de Virginia, de los EUA. Los experimentos de transfección se llevaron a cabo en células HEK-293 (derivadas de riñón de embrión humano) y células CaSki, utilizando el reactivo JetPEI (Polypus Transfection, Illkirch, Francia). Brevemente, las transfecciones se realizaron en cajas Petri de 35 mm con una monocapa celular al 60-80% de confluencia. En cada experimento se transfectaron dos DNAs, el del canal Na<sub>v</sub>1.6 y el de la proteína verde fluorescente (GFP). Las células se incubaron durante 4 horas con una mezcla de transfección que incluyó 2.5 µg de DNA del canal, 200 ng del DNA de la GFP y 5 µL del agente transfectante JetPEI en un volumen final de 200 µL de 150 mM NaCl y 2 ml de medio completo. Al término de dicho periodo se retiró el medio de las cajas y se sustituyó por medio completo. Después de 48 horas de iniciada la transfección, las células fueron tripsinizadas y sembradas en trozos de cubreobjetos para el registro electrofisiológico con la técnica de *patch clamp* antes descrita; las células seleccionadas para el registro fueron aquellas en las que se detectó la fluorescencia de la GFP. Siguiendo el mismo procedimiento se transfectaron células CaSki para realizar experimentos de *patch clamp* como para ensayos de invasividad.

### **5.13. Ensayos de migración e invasividad**

Los ensayos de migración e invasividad se realizaron empleando el kit Matrigel Invasion Chambers (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA). Este ensayo se basa en el principio de la cámara de Boyden, mismo que consta de dos cámaras (una dentro de la otra) separadas por una membrana de polietileno con poros de 8 µm con (para invasividad) o sin recubrimiento de



Matrigel™ (para migración). El Matrigel™ es un material que simula el ambiente extracelular al contener proteínas características de este ambiente como laminina y colágeno IV, al igual que diversos factores de crecimiento, como los factores de crecimiento epidermal y fibroblástico. En la cámara superior se coloca una cantidad conocida de células ( $5 \times 10^4$ ) en un medio pobre en SFB (5%), mientras que en la cámara inferior se agrega medio de cultivo con 15% de SFB que funciona como quimioatrayente. El Matrigel™ bloquea los poros de la membrana de polietileno impidiendo el paso de las células a través de ellos, sin embargo, las células capaces de invadir liberan enzimas proteolíticas que degradan el Matrigel™ y permiten la migración hacia el quimioatrayente en la cámara inferior. Las cajas multipozos fueron incubadas durante 48 horas a 37°C en una incubadora de CO<sub>2</sub>. Después de la incubación, se removieron con algodón las células que no invadieron, se transfirió el inserto a un pozo limpio con 400 µl de medio de cultivo y 30 µl de reactivo de MTT (Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico; ATCC) y se incubó 3 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente se retiró el medio de cultivo del pozo para eliminar el exceso de MTT que no fue metabolizado, se añadió dimetilsulfóxido (DMSO) para disolver las sales de formazán generadas de forma intracelular por la captación y reducción del MTT, y se midió la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 570 nm en un lector de placas multipozos Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Identificación de los mensajeros de las subunidades $\alpha$ y $\beta$ de los canales $\text{Na}_v$ en las líneas celulares de CaCu

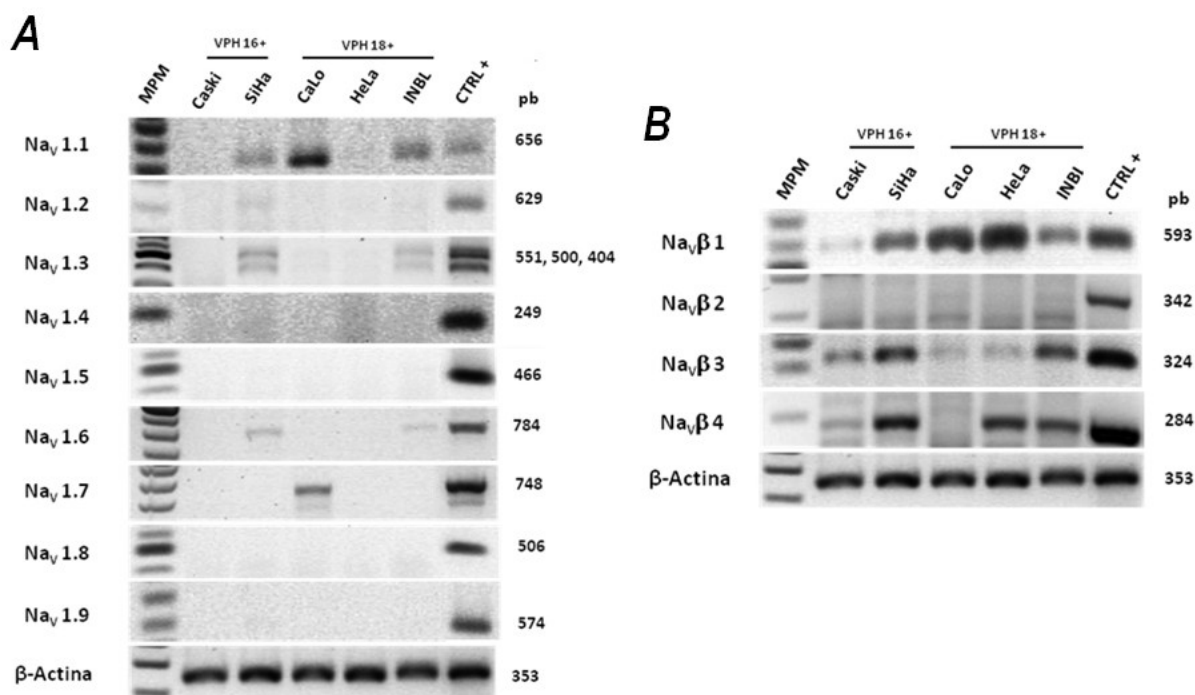
#### 6.1.1 Identificación de las subunidades $\alpha$ y $\beta$ de los canales $\text{Na}_v$ por RT-PCR estándar

El primer abordaje para investigar la expresión de los canales  $\text{Na}_v$  en las líneas celulares de CaCu, consistió en determinar la expresión del mRNA de las 9 subunidades  $\alpha$  y las 4 subunidades  $\beta$  de estos canales, así como de  $\beta$ -actina, por medio de RT-PCR estándar en las líneas de CaCu. Los resultados se muestran en la Figura 10. Contrario a lo observado en cultivos primarios y biopsias de CaCu (Diaz et al., 2007; Sánchez-Sandoval, 2011; Hernandez-Plata et al., 2012), las líneas celulares de CaCu presentaron una baja expresión del mensajero de las subunidades  $\alpha$  de los canales  $\text{Na}_v$  con la técnica de RT-PCR estándar (Fig. 10A). Concretamente, el mensajero de  $\text{Na}_v1.6$  sólo se detectó en células SiHa e INBL, al igual que  $\text{Na}_v1.3$ , mientras que  $\text{Na}_v1.1$  se presentó además en CaLo. Este último fue el único tipo celular de CaCu en el que se amplificó el mensajero de  $\text{Na}_v1.7$ . Asimismo, ninguno de los mensajeros de los canales  $\text{Na}_v$  resistentes a la TTX ( $\text{Na}_v1.5$ ,  $\text{Na}_v1.8$  y  $\text{Na}_v1.9$ ) se detectó mediante esta técnica. Por el contrario, los amplicones correspondientes al mensajero de las subunidades accesorias  $\beta$ , con la aparente excepción de  $\text{Na}_v\beta2$ , fueron visiblemente detectados en la mayoría de las líneas celulares de CaCu (Fig. 10B).

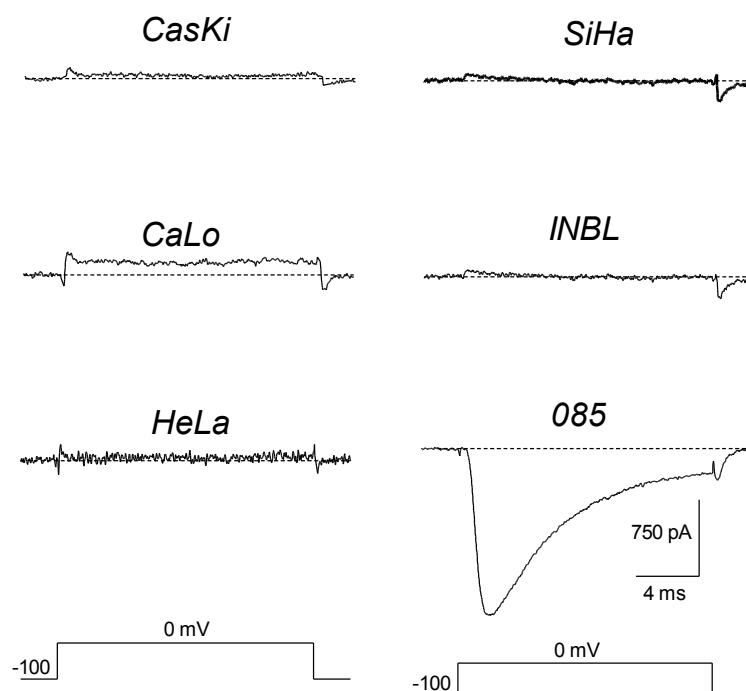
#### 6.1.2. Registro de corrientes de sodio en las líneas celulares de CaCu

En paralelo con la determinación de la expresión del mRNA de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los canales  $\text{Na}_v$  en las líneas celulares de CaCu, se realizaron los experimentos de *patch clamp* para investigar la presencia de corrientes de sodio generadas por canales  $\text{Na}_v$  en las mismas células de CaCu. Los resultados se presentan de manera resumida en la Fig. 11. En congruencia con los resultados de RT-PCR estándar, los registros con la técnica de *patch clamp* demostraron la ausencia de corrientes de sodio activas por voltaje en las líneas celulares de CaCu estudiadas en el presente trabajo de tesis. En ninguna de las más de 100 células registradas a la fecha se han encontrado indicios de corrientes transportadas por canales  $\text{Na}_v$ . Para descartar cualquier posible problema técnico en los presentes registros de *patch clamp*, se utilizó como control células del

cultivo primario 085 de CaCu (Diaz et al., 2007), en las que se registraron corrientes de sodio bastante robustas. En resumen, los experimentos de RT-PCR estándar y los de *patch clamp* demuestran que las líneas celulares de CaCu estudiadas aquí no expresan canales  $Na_v$  funcionales en la membrana plasmática de dichas células. Estos resultados inesperados hasta cierto punto, plantean dos preguntas: 1) ¿La expresión de los canales  $Na_v$  en las líneas celulares de CaCu es regulada por algún factor extracelular presente en las biopsias y en los cultivos primarios de CaCu, pero ausente en los cultivos de estas líneas celulares, factores como el estradiol o el factor de crecimiento epidermal? 2) ¿En ausencia de los canales  $Na_v$ , cuál es entonces el papel de las subunidades  $\beta$  en el fenotipo de las líneas celulares de CaCu? Los resultados del abordaje experimental para responder estas preguntas se presentan en las dos secciones siguientes.



**Figura 10. Expresión diferencial del mRNA de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los canales  $Na_v$  en las líneas celulares de CaCu.** Resultados de las reacciones de RT-PCR estándar en las líneas celulares CaSki y SiHa (positivas para VPH-16), y CaLo, HeLa e INBL (positivas para VPH-18) en las cuales se utilizaron *primers* específicos para las subunidades  $\alpha$  (A) y  $\beta$  (B) señaladas a la izquierda de cada panel. Como control de carga de RNA se utilizaron *primers* comerciales para amplificar el mRNA de  $\beta$ -actina (línea inferior). La separación de los productos de PCR se llevó a cabo en geles de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio. Los números a la derecha indican el número de pares de bases esperado para cada amplicón. MPM: marcador de peso molecular de 100 pb.



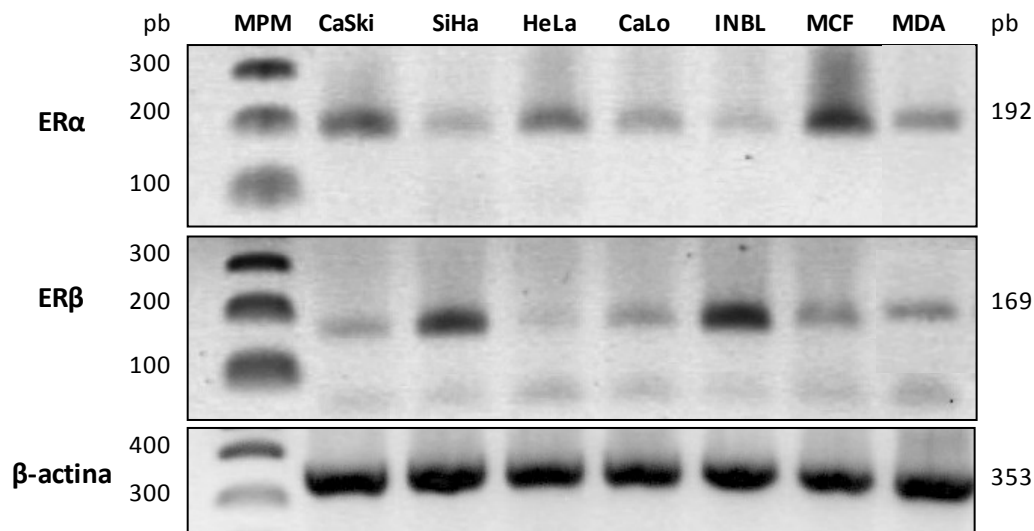
**Figura 11. Trazos representativos de corrientes registradas en líneas celulares de CaCu.** Ejemplos de registros de corriente en las líneas celulares CaSki, CaLo, HeLa, SiHa e INBL, así como en el cultivo primario 085 de CaCu. Las corrientes fueron evocadas por pulsos despolarizantes a 0 mV de 16 ms de duración a partir de un potencial de mantenimiento de -100 mV. Ninguna de las líneas celulares presentó corrientes de sodio activadas por voltaje. De acuerdo con lo ya reportado anteriormente (Diaz et al., 2007), el cultivo primario 085 presentó corrientes de sodio robustas.

## 6.2. Determinación del efecto del estradiol y del factor de crecimiento epidérmico en la expresión de los canales $Na_v$ en líneas celulares de CaCu

### 6.2.1. Identificación del mRNA de receptores nucleares de estrógenos por RT-PCR de punto final

Antes de investigar el efecto del estradiol en las líneas celulares de CaCu, se determinó por medio de RT-PCR estándar la expresión de los mensajeros de los receptores nucleares a estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  ( $ER\alpha$  y  $ER\beta$ , respectivamente), en las 5 líneas celulares de CaCu, así como en las células MCF-7 y MDA-MB-231 (de cáncer de mama), las cuales sirvieron como controles positivo y negativo, respectivamente, para la expresión de dichos receptores. Los resultados muestran que todas las líneas celulares analizadas presentan el mensajero de ambos receptores nucleares de estrógenos, aunque se observaron diferencias en la intensidad de los amplicones (Fig. 12). De las líneas celulares de CaCu, las células CaSki fueron las que expresaron en mayor cantidad al mensajero del  $ER\alpha$ , mientras que las líneas celulares SiHa e INBL presentaron de forma muy

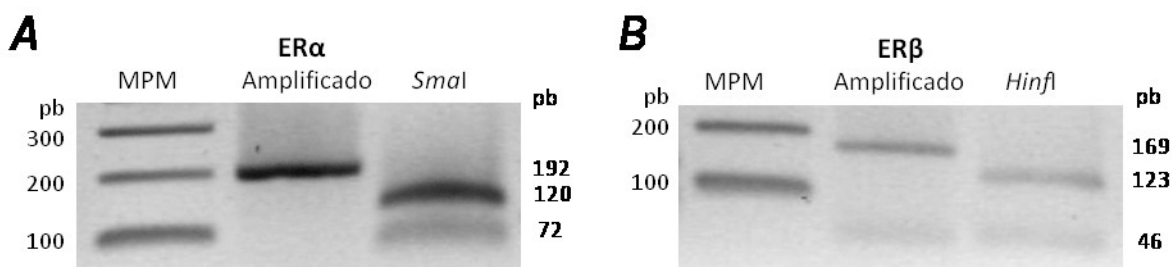
abundante el mensajero del ER $\beta$ . Interesantemente, ambos receptores también se detectaron en las células MDA-MB-231, en las cuales no se habían encontrado previamente dichos receptores (Weigel & deConinck, 1993).



**Figura 12. Expresión del mRNA de los receptores estrogénicos  $\alpha$  y  $\beta$  en las líneas celulares de CaCu.** Resultados de las reacciones de RT-PCR estándar para ER $\alpha$ , ER $\beta$  y  $\beta$ -actina en las líneas celulares CaSki, SiHa, HeLa, CaLo, e INBL, así como en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama. Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio. Los números a la derecha indican el tamaño en pares de bases (pb) esperado para cada amplicón; y los números de la izquierda indican el tamaño de las bandas del marcador de peso molecular (MPM).

Es importante mencionar que los *primers* utilizados para la amplificación de los receptores nucleares de estrógenos están dirigidos a la región cercana al extremo amino de la proteína. Ambos receptores presentan varias isoformas, de las cuales no todas son funcionales y no todas responden al tratamiento con estrógenos (Heldring et al., 2007), por lo que la observación de amplicones como resultado de las reacciones de RT-PCR no implica necesariamente que todas las líneas celulares presenten actividad estrogénica nuclear. Por ello, para descartar una posible amplificación inespecífica y corroborar la identidad molecular de los fragmentos amplificados, el producto de la reacción de RT-PCR para el ER $\alpha$  en células MCF-7, así como el producto de la amplificación del ER $\beta$  en la línea celular INBL, fueron caracterizados mediante enzimas de restricción específicas para cada uno de ellos y los productos de la digestión enzimática se analizaron por electroforesis. La digestión del receptor  $\alpha$  con la enzima *SmaI* generó las dos bandas esperadas, una de 120 y otra de 72 pb (Fig. 13A); por su parte el amplicón del receptor  $\beta$

de 169 pb se fragmentó en dos bandas más pequeñas al digerirse con la enzima *Hinfl*: una de 123 y otra de 46 pb (Fig. 13B).

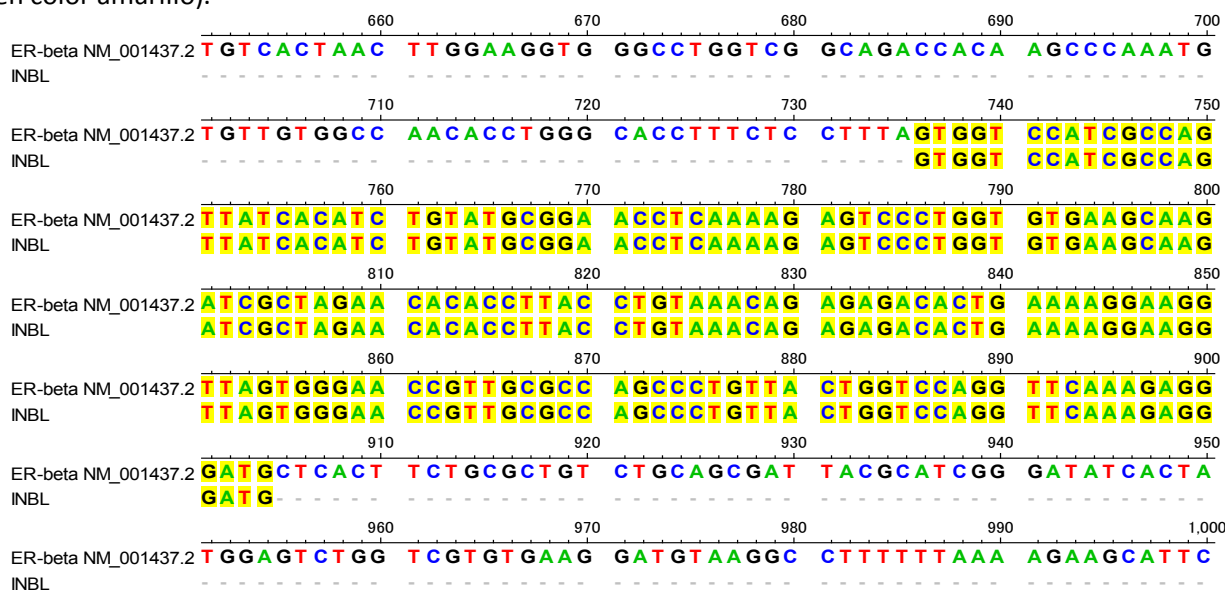


**Figura 13. Digestión enzimática del fragmento amplificado de los receptores ER $\alpha$  y ER $\beta$  en las líneas celulares de CaCu.** En cada panel se muestra la separación mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% de los fragmentos resultantes de la digestión con la enzima correspondiente (carril derecho), comparado con el mismo fragmento sin digerir (carril central). En el carril izquierdo se muestran las bandas del marcador de peso molecular de 100 pb (MPM). A la derecha de cada panel se muestra el tamaño en pb del fragmento amplificado y de los productos de la digestión, los cuales corresponden a los tamaños esperados.

Como medida adicional para caracterizar los productos generados por RT-PCR para los receptores de estrógenos nucleares, éstos fueron subclonados en el vector pJET1.2/blunt y secuenciados en la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular para corroborar su identidad molecular. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa DNAsis Max (MiraiBio) y comparadas con las secuencias correspondientes reportadas en el GenBank. En el caso del receptor  $\alpha$  se seleccionó el producto de la amplificación de las células MCF-7 por ser el control positivo, el de CaSki, por ser la línea celular de CaCu que presentó mayor expresión de este receptor, y el de las células MDA-MB-231, porque a pesar de haber sido reportadas como negativas al tratamiento con hormonas (Weigel & deConinck, 1993), nuestros resultados de RT-PCR indican la presencia del RNA mensajero. En todos los casos, el producto amplificado tiene 100% de identidad con la secuencia esperada de acuerdo a lo reportado en el GenBank (Fig. 14). Para el caso del receptor  $\beta$  se secuenció el producto de PCR de las células INBL, ya que éstas presentaron la mayor abundancia relativa del mensajero de este gen (Fig. 12). El alineamiento de dicha secuencia reveló un 100% de identidad con la del GenBank (Fig. 15).



**Figura 14. Alineamiento del fragmento del ER $\alpha$  amplificado por PCR en líneas celulares.** El alineamiento se realizó con el DNA de la secuencia del mensajero del ER $\alpha$  reportada en el GenBank (NM\_001125.3) y la de las secuencias obtenidas a partir de los amplicones de RT-PCR provenientes de las líneas celulares MCF-7, CaSki y MDA-MB-231. En todos los casos se observó un 100% de identidad con la secuencia reportada (en color amarillo).



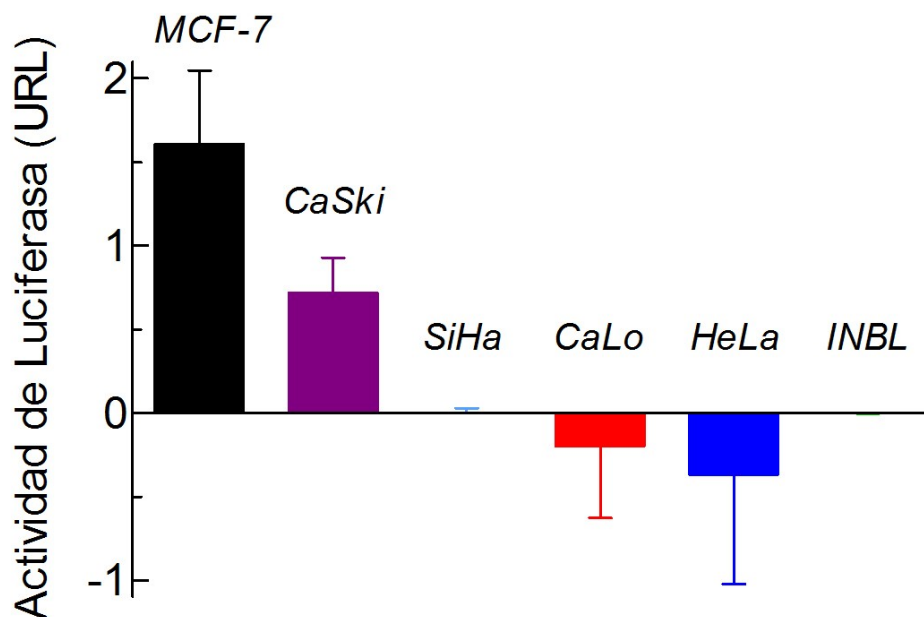
**Figura 15. Alineamiento del fragmento del ER $\beta$  amplificado por PCR en INBL.** Se muestra el alineamiento entre la secuencia del DNA reportada en el GenBank para el ER $\beta$  (NM\_001437.2) y la obtenida del fragmento amplificado por PCR en la línea celular INBL. Nuevamente el color amarillo indica un 100% de identidad entre las secuencias.

### **6.2.2. Actividad estrogénica nuclear**

Debido a que en la literatura existen datos contradictorios sobre la presencia o ausencia de receptores nucleares a estrógenos en algunas líneas celulares como CaSki y SiHa, y que no existe información al respecto para las líneas CaLo e INBL, se realizó el análisis de la actividad estrogénica nuclear de cada línea celular utilizando un vector reportero con tres elementos de respuesta a estrógenos. El resumen de los resultados se presenta en la Fig. 16. Los valores de la actividad de luciferasa (cuya expresión está en función de la acción de los receptores a estrógenos) fueron normalizados con respecto a la actividad de  $\beta$ -galactosidasa para corregir posibles variaciones en la eficiencia de la transfección, y los valores se presentan como el incremento en la actividad de luciferasa (o estrogénica) después del tratamiento con 10 nM de  $\beta$ -estradiol durante 24 h para cada línea celular investigada. Como se puede observar en la gráfica de la Fig. 16, las células MCF-7 (cáncer de mama) son las más sensibles al tratamiento con estradiol, ya que su actividad estrogénica aumentó en más de 150% después del tratamiento con el estradiol. Por su parte, las células CaSki fueron las únicas dentro de las líneas celulares de CaCu que presentaron un aumento en la actividad estrogénica en respuesta al tratamiento con la hormona, por el contrario, las células CaLo y HeLa mostraron una tendencia (aunque no significativa) a disminuir la respuesta al estradiol, mientras que las células SiHa e INBL fueron insensibles al tratamiento.

De acuerdo a lo reportado previamente (Zhai et al., 2010), las células HeLa no presentaron actividad estrogénica definida, a pesar de que la reacción de RT-PCR para ER $\alpha$  muestra la presencia del mensajero de este receptor. De las líneas celulares de CaCu, la que tiene mayor cantidad de mensajero del ER $\alpha$  es CaSki (Fig. 12), lo cual es consistente con la observación de que esta línea celular es la única que presenta una clara actividad estrogénica nuclear.

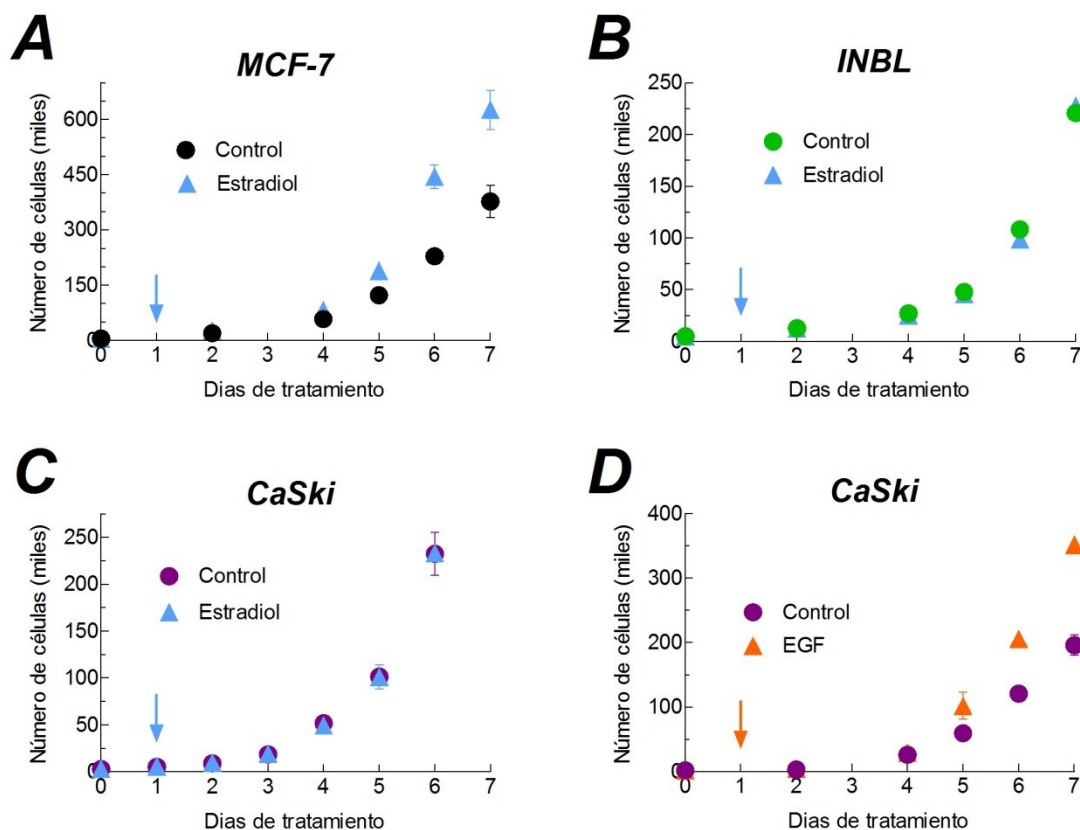




**Figura 16. Actividad estrogénica nuclear relativa en líneas celulares de CaCu.** La gráfica muestra los cambios en la actividad de Luciferasa (directamente proporcional a la actividad estrogénica nuclear) después del tratamiento con 10 nM de  $\beta$ -estradiol durante 24 h, de las líneas celulares indicadas. La línea celular MCF-7 de cáncer de mama se utilizó como control positivo de la actividad estrogénica. Los datos fueron normalizados con respecto a la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa en cada línea celular. Los valores obtenidos para las células SiHa e INBL son muy cercanos a cero, por lo que no se logran distinguir en la gráfica. Se presentan los resultados de un experimento representativo, de un total de tres. Las columnas son el promedio de triplicados, y las barras son el error estándar de la media.

### 6.2.3. Ensayo de proliferación en presencia de $\beta$ -estradiol

Para determinar si el  $\beta$ -estradiol promueve la proliferación de las células CaSki, tal como lo hace en la línea celular MCF-7, se realizaron ensayos *in vitro* para evaluar dicha respuesta. En estos experimentos se incluyeron las líneas celulares CaSki e INBL, la primera por ser la única de las líneas celulares de CaCu estudiadas que presentó actividad estrogénica, y la segunda por tener en abundancia el mensajero del receptor de estrógenos  $\beta$ . Los resultados se presentan en la Fig. 17, en donde se puede observar que efectivamente, la proliferación de las células MCF-7 aumenta considerablemente con el tratamiento de  $\beta$ -estradiol (10 nM; Fig. 17A). Sin embargo, en el caso de las células CaSki e INBL no se observaron cambios significativos en la proliferación en respuesta al tratamiento con la hormona (Fig. 17B y C).



**Figura 17. Efecto del  $\beta$ -estradiol y del EGF en la proliferación de las líneas celulares MCF-7, INBL y CaSki.** Gráficas de proliferación en presencia y ausencia de 10 nM de  $\beta$ -estradiol de las líneas celulares MCF-7 (A), INBL (B) y CaSki (C), así como de estas últimas en presencia y ausencia de 0.2 ng/mL de EGF (D). Los datos se presentan como el promedio de dos observaciones  $\pm$  DE del número de células totales a los tiempos indicados. En todos los experimentos el tratamiento con la hormona o el EGF comenzó a las 24 horas (señalado con una flecha).

#### 6.2.4. Efecto del $\beta$ -estradiol en la expresión funcional de los canales $Na_v$

El efecto del  $\beta$ -estradiol en la expresión funcional de los canales  $Na_v$  se analizó con la técnica de *patch clamp* en la modalidad de célula completa en la línea celular CaSki después de 24 y 48 horas de tratamiento con 4 concentraciones diferentes de  $\beta$ -estradiol: 1, 10, 50 y 100 nM. Para cada condición se registraron al menos 5 células (más de 40 células en total), pero en ningún caso se encontraron evidencias de corrientes de sodio activadas por voltaje. Debido a que la línea celular INBL expresó de forma abundante el mensajero del ER $\beta$  (Fig. 12), estas células también fueron sometidas al tratamiento con 10 nM de  $\beta$ -estradiol durante 24 y 48 horas. Sin embargo, tampoco en estas células se detectaron corrientes de sodio activadas por voltaje.

### **6.2.5. Ensayo de proliferación de células CaSki en presencia de EGF**

El otro factor extracelular que se utilizó para investigar su posible efecto en la expresión de los canales  $Na_v$  fue el factor de crecimiento epidermal (EGF). En primer lugar se verificó el efecto del tratamiento con EGF sobre la proliferación celular de las células CaSki, para lo cual ya se ha reportado previamente un incremento significativo en la tasa de proliferación de estas células en presencia de 0.2 ng/mL de EGF (Castrilli et al., 1997). Se eligió esta línea celular debido a que es la única línea celular de CaCu que presentó actividad estrogénica nuclear, y además se sabe que responde al tratamiento con EGF. A partir de aquí, el resto de los experimentos se realizaron únicamente con células CaSki. Los resultados del ensayo de proliferación de células CaSki en presencia del EGF se muestran en la Fig. 17D, en la que se puede observar que efectivamente se produce un aumento sustancial en la proliferación de las células al ser sometidas al tratamiento con EGF después de 7 días de tratamiento.

### **6.2.6. Efecto del EGF en la expresión funcional de los canales $Na_v$**

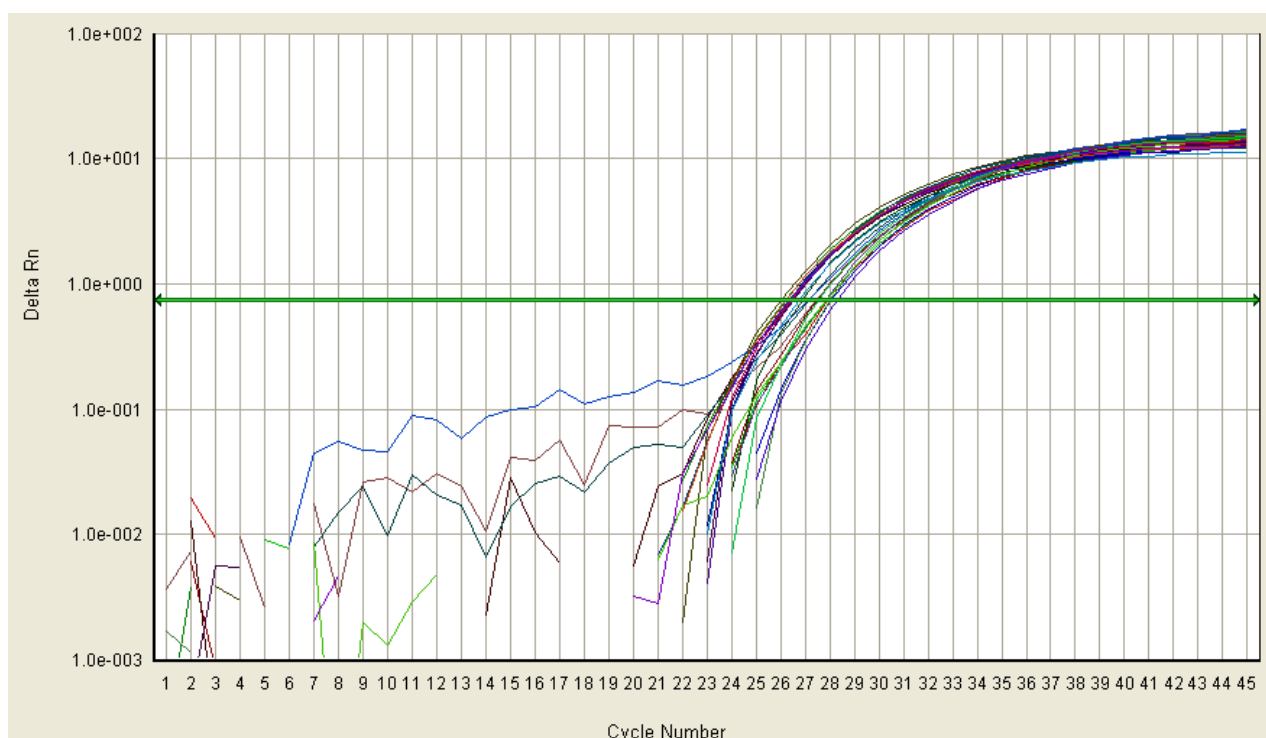
El efecto del EGF en la expresión de los canales  $Na_v$  en células CaSki se analizó con la técnica de *patch clamp* en la modalidad de célula completa. Las células se incubaron durante 24 y 48 horas en presencia de diferentes concentraciones de EGF (0.2, 1, 10 y 50 ng/mL). De nueva cuenta, al menos cinco células de cada condición fueron investigadas y en ningún caso se encontraron evidencias de corrientes de sodio activadas por voltaje.

Los resultados de la presente sección demuestran que el  $\beta$ -estradiol y el EGF no tienen un efecto sobre la expresión funcional de los canales  $Na_v$  en células de CaCu, en particular sobre la línea celular CaSki. Por lo tanto, en la siguiente sección se investigó la participación de las subunidades  $\beta$  en el fenotipo de las líneas celulares de CaCu.

### 6.3. Participación de las subunidades $\beta$ en el fenotipo de las líneas celulares de CaCu

#### 6.3.1. Análisis de la expresión génica de las subunidades $\beta$ por PCR en tiempo real

Para realizar un análisis cuantitativo de la expresión del mRNA de las cuatro subunidades  $\beta$  de los canales  $\text{Na}_v$  en las 5 líneas celulares de CaCu se llevaron a cabo experimentos de qPCR. Después de cada reacción de qPCR se fijó un valor de umbral para todas las reacciones cuidando que todas ellas se encontraran en la fase exponencial (Fig. 18).



**Figura 18. Ejemplo de la amplificación del gen de  $\text{Na}_v\beta 1$  mediante qPCR.** Gráfica representativa de la amplificación del gen de  $\text{Na}_v\beta 1$  en las reacciones de qPCR empleando sondas TaqMan. Cada una de las líneas de color muestra el incremento en la fluorescencia (*Delta Rn*) debido a la acumulación del amplicón para  $\text{Na}_v\beta 1$  conforme avanza la reacción de qPCR (*Cycle Number*). La línea verde horizontal indica el umbral elegido para determinar los valores de  $C_T$  de cada reacción (representadas por cada una de las líneas de colores que cortan cuasi perpendicularmente la línea umbral). La imagen fue tomada directamente de la pantalla de la computadora integrada al equipo de qPCR a través del programa SDS 1.2.2. Las reacciones (por triplicado) corresponden a las diferentes líneas celulares de CaCu estudiadas en el presente trabajo.

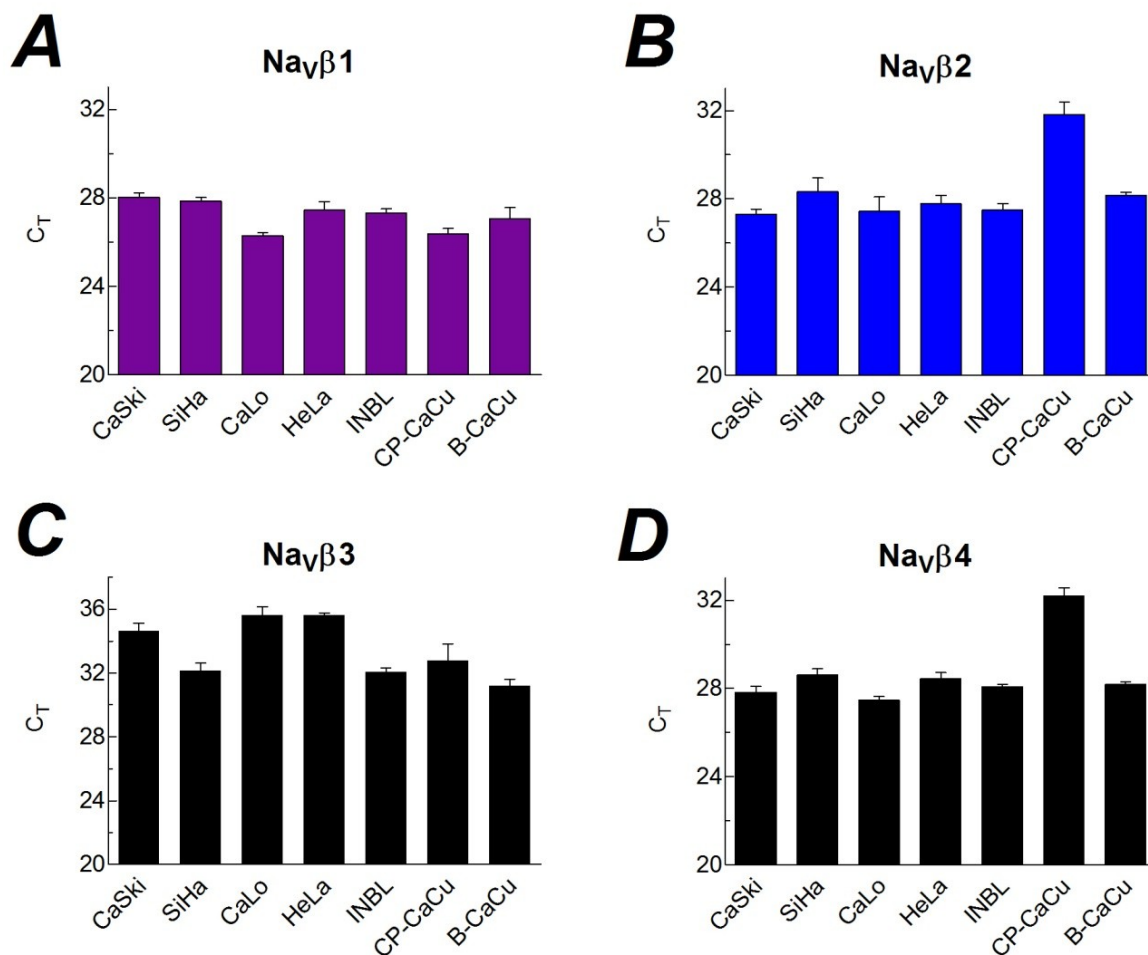
Los valores de  $C_T$  de cada uno de los triplicados fueron promediados para obtener un valor de  $C_T$  por ensayo y su correspondiente desviación estándar. El resumen de los resultados se presenta

en la Fig. 19. Los niveles de expresión de las subunidades  $Na_v\beta 1$ ,  $Na_v\beta 2$  y  $Na_v\beta 4$  fueron muy similares en todas las líneas celulares investigadas, con valores de  $C_T$  muy cercanos a 28, lo cual ubica dichos genes dentro del intervalo de moderada expresión; mientras que la subunidad  $Na_v\beta 3$  se encuentra en el intervalo de los genes de baja expresión, ya que los valores de  $C_T$  observados fueron superiores a 31 en todos los casos. Debido a la mayor sensibilidad de la técnica de qPCR comparada con la PCR estándar, en este caso se logró detectar sin problema el mensajero de la subunidad  $Na_v\beta 2$  que no había sido amplificado adecuadamente por PCR estándar (Fig. 10B). Interesantemente, esta subunidad fue la que presentó el valor de  $C_T$  más bajo entre las cuatro subunidades  $Na_v\beta$  en las células CaSki (Fig. 19B), lo cual indica que  $Na_v\beta 2$  es la subunidad con más altos niveles de expresión a nivel de mRNA en esta línea celular. Para fines de comparación en las reacciones de qPCR también se incluyeron ensayos para los cultivos primarios de CaCu (cultivos 085, 354 y JP; Diaz et al., 2007), así como para dos biopsias de CaCu positivas a VPH-18. Los valores de  $C_T$  para estas muestras son consistentes con lo reportado previamente por nuestro grupo de investigación, es decir, la subunidad  $Na_v\beta 1$  es la más abundante y  $Na_v\beta 2$  y  $Na_v\beta 4$  las menos expresadas en los cultivos primarios (Hernandez-Plata et al., 2012), mientras que las biopsias de CaCu positivas a VPH-18 presentan un comportamiento similar a las líneas celulares de CaCu (Sánchez-Sandoval, 2011).

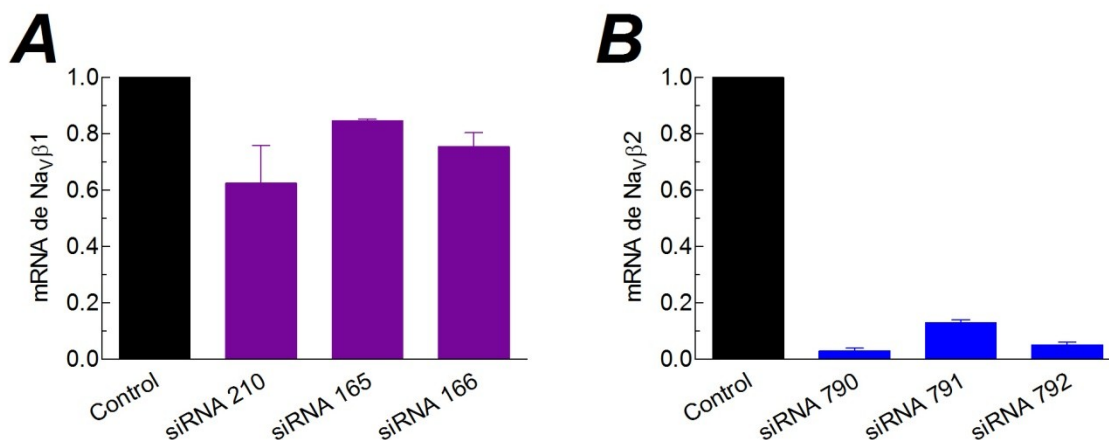
### **6.3.2. Abatimiento de la expresión de subunidades $\beta$ de los canales $Na_v$**

La expresión del mRNA de las subunidades  $Na_v\beta 1$  y  $Na_v\beta 2$  se abatió en las células CaSki mediante la transfección de tres diferentes *siRNAs* para cada una de las subunidades. El efecto de los RNAs de interferencia se determinó después de someter a las células a 3 concentraciones diferentes (20, 50 y 100 nM) durante 24 y 48 horas de tratamiento. Al término de cada uno de los tratamientos se obtuvo el RNA total de cada grupo de células, y se realizaron experimentos de qPCR y los resultados se analizaron con el método de  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  usando HPRT1 como gen normalizador. De esta forma se encontró que el mayor efecto de silenciamiento de la subunidad  $Na_v\beta 1$  se produce con el *siRNA* 210 a una concentración de 50 nM y por un periodo de incubación de 24 horas (disminución de 37% respecto al control; Fig. 20A). En el caso de la subunidad  $Na_v\beta 2$ , los tres *siRNAs* empleados (a 20 nM durante 24 horas) abatieron la expresión

del mensajero en más del 85%; en particular el *siRNA* 790 bloqueó el 97% de la expresión del mRNA de la subunidad  $\text{Na}_v\beta_2$  (Fig. 20B). Cabe destacar que ni el tratamiento con concentraciones mayores de *siRNAs* (hasta 100 nM) ni incubaciones por 48 horas resultaron en un mayor bloqueo de la expresión del mensajero de ninguna de las dos subunidades. Asimismo, cotransfecciones de 2 *siRNAs* dirigidos contra  $\text{Na}_v\beta_1$  tampoco produjeron un efecto mayor al observado con 50 nM de *siRNA* 210.



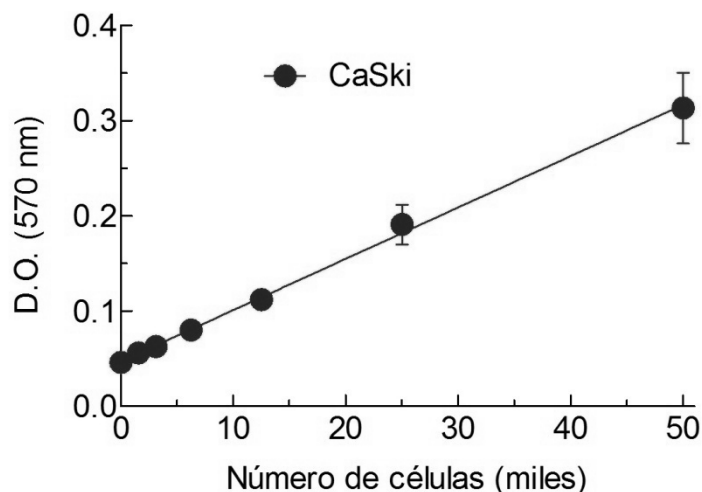
**Figura 19. Niveles relativos del mRNA de las subunidades  $\beta$  de los canales  $\text{Na}_v$  en las líneas celulares de CaCu.** Se grafican los valores promedio de  $C_T$  para cada mRNA  $\pm$  la desviación estándar obtenidos de reacciones de qPCR por triplicado en cada una de las líneas celulares indicadas. También se presentan los datos de los cultivos primarios de CaCu (085, 354 y JP), agrupados como CP-CaCu; así como los de dos biopsias de CaCu positivas a VPH-18 (B-CaCu). En los experimentos de qPCR se incluyó el gen que codifica para la subunidad ribosomal 18S como control interno, cuyo valor promedio de  $C_T$  fue de  $11.34 \pm 0.27$  ( $n = 10$ ).



**Figura 20. Disminución de la expresión relativa del mensajero de  $\text{Nav}\beta_1$  y  $\text{Nav}\beta_2$  en células CaSki mediante la transfección de *siRNAs*.** La cuantificación del mensajero de las subunidades  $\beta$  por qPCR se realizó después de 24 horas de la transfección respectiva. Se muestran los niveles relativos del mRNA de  $\text{Nav}\beta_1$  (A) y  $\text{Nav}\beta_2$  (B) como resultado del tratamiento con 50 nM y 20 nM, respectivamente, de los *siRNAs* indicados. Los valores se normalizaron respecto al de las células que recibieron el mismo proceso de transfección pero sin *siRNA* alguno (Control). Resultados representativos de tres experimentos independientes. Se presentan los valores promedios de duplicados  $\pm$  la desviación estándar para cada *siRNA*.

### 6.3.3. Ensayos de migración e invasividad

Los ensayos de migración e invasividad se realizaron utilizando células CaSki con o sin tratamiento con *siRNAs* dirigidos contra las subunidades  $\text{Nav}\beta_1$  y  $\text{Nav}\beta_2$ . El número de células que fueron capaces de migrar y/o invadir a través de la membrana de polietileno con poros de 8  $\mu\text{m}$  de diámetro después de 48 horas se determinó mediante el método colorimétrico de MTT (formación de sales de formazán a partir del colorante bromuro de tetrazolio). Pevio a los ensayos de migración e invasividad se construyó una curva de calibración del número de células CaSki con el método de MTT para determinar el intervalo del número de células que responden al MTT de manera lineal y obtener así la ecuación que relacione el valor de absorbancia a 570 nm con un determinado número de células CaSki. Los resultados de incubar cantidades conocidas de células CaSki en presencia de MTT por un periodo de 3 horas se presentan en la Fig. 21. Como se puede observar en el gráfico, el método de MTT proporcionó una linealidad en la formación de sales de formazán generadas por la actividad de hasta 50,000 células CaSki.



**Figura 21. Curva de calibración del método de MTT para las células CaSki.** Gráficos de la absorción a 570 nm en función del número de células CaSki. Cada punto experimental es el promedio  $\pm$  la desviación estándar de tres réplicas.

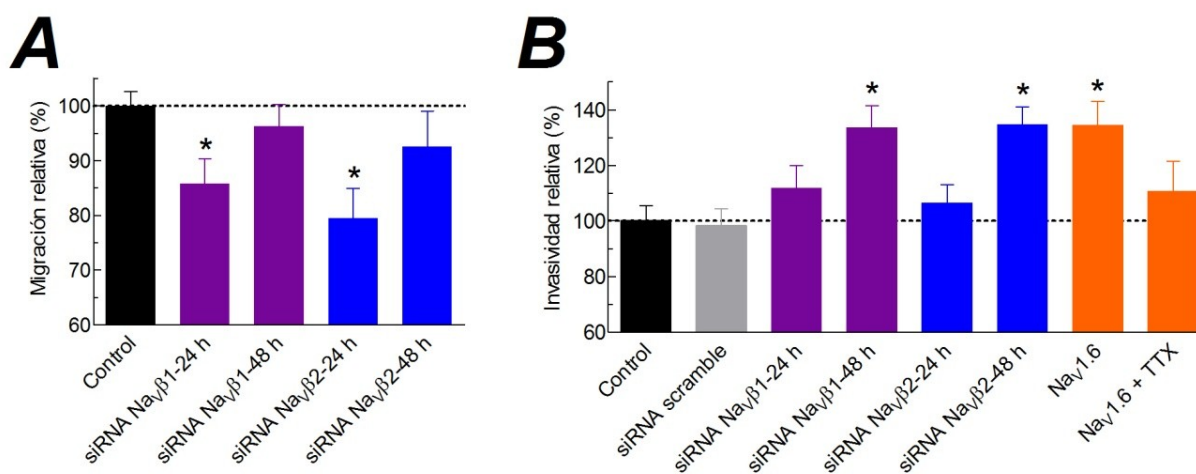
Los ensayos de migración se realizaron utilizando células CaSki con o sin tratamiento con *siRNAs* dirigidos contra las subunidades  $Na_v\beta 1$  y  $Na_v\beta 2$  durante 24 o 48 horas. El número de células que fueron capaces de migrar a través de la membrana de polietileno con poros de 8  $\mu m$  de diámetro después de 48 horas se determinó por reducción de MTT y medición de la absorción de cada muestra a una longitud de onda de 570 nm. Como control se utilizaron células CaSki tratadas con agente transfectante en ausencia de *siRNAs* 24 horas antes de iniciar el ensayo de migración. Se realizaron 3 experimentos independientes, y cada condición experimental se analizó por duplicado.

La migración relativa de cada condición con respecto a las células control se muestra en la Fig. 22A, en donde se puede observar que el bloqueo de la expresión de las subunidades beta con *siRNAs* produce una disminución en la capacidad de migración de las células, mostrándose el mayor efecto al tratar a las células durante 24 horas con *siRNAs* dirigidos contra  $Na_v\beta 2$ , donde la migración se reduce en un 20%, mientras que las células tratadas con *siRNAs* para  $Na_v\beta 1$  durante el mismo tiempo muestran una reducción en la migración de aproximadamente 15% en comparación con la condición Control. Curiosamente el efecto en la disminución en la capacidad



de migración no fue significativo después de 48 horas del tratamiento con los RNAs de interferencia.

Por su parte, los ensayos de invasividad se realizaron de igual manera en células CaSki con o sin tratamiento con *siRNAs* dirigidos contra las subunidades  $\text{Na}_v\beta 1$  y  $\text{Na}_v\beta 2$  durante 24 o 48 horas. En este caso, además se analizó el efecto en la invasividad de las células CaSki transfectadas con el canal  $\text{Na}_v 1.6$  en ausencia y presencia de  $1 \mu\text{M}$  de TTX (bloqueador de los canales de sodio). Debido a que en nuestro laboratorio hemos descrito que la actividad de este canal favorece la capacidad invasiva de cultivos primarios de CaCu y que dicha capacidad se reduce al bloquear la actividad del mismo canal (Hernandez-Plata et al., 2012), se decidió incluir estas condiciones experimentales para estudiar la invasividad de las células CaSki. Al igual que en los ensayos de migración, también se incluyó una condición Control con una transfección simulada (no *siRNA*), y en algunos experimentos se transfectaron células CaSki con un *siRNA scramble* (*siRNA* que no tiene una secuencia blanco).



**Figura 22. Efecto en la capacidad de migración e invasividad de células CaSki con bloqueo en la expresión de subunidades beta.** Se muestra el porcentaje  $\pm$  la desviación estándar ( $n = 5$ ) de migración (**A**) y de invasividad (**B**), de las células CaSki después de 24 o 48 horas de haber sido tratadas con RNAs de interferencia contra  $\text{Na}_v\beta 1$  (en columnas moradas) o  $\text{Na}_v\beta 2$  (en azul), con respecto a la condición Control (simulación de transfección, columnas negras). En el caso de la invasividad, se agrega el control con *siRNA* scramble (en gris) y células CaSki transfectadas con el canal  $\text{Na}_v 1.6$  (en anaranjado) en ausencia y presencia de  $1 \mu\text{M}$  de la toxina TTX. \* Diferencias significativas respecto al Control;  $P < 0.05$ .

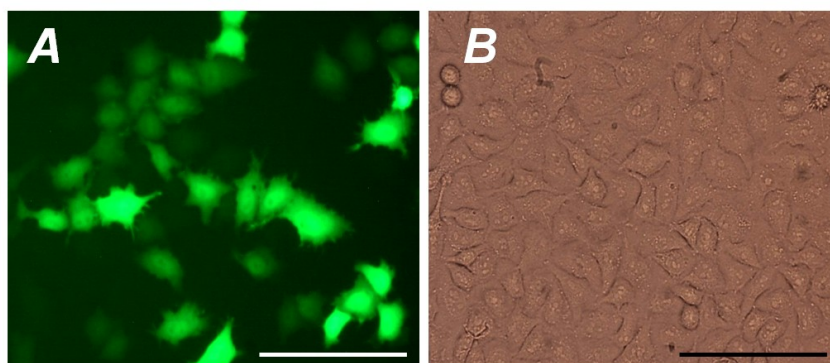
El número de células que fueron capaces de degradar el Matrigel™ y migrar a través de la membrana de polietileno con poros de 8  $\mu\text{m}$  de diámetro después de 24 y 48 horas se determinó por reducción de MTT y medición de la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 570 nm. Se realizaron cinco experimentos independientes, y en cada uno las diferentes condiciones se analizaron por duplicado. A diferencia de lo observado con los ensayos de migración, la capacidad invasiva en las células CaSki no se modificó de manera significativa después de 24 horas de tratamiento con los *siRNAs*, y aún más interesante, a las 48 horas se observó un aumento significativo del número de células con capacidad invasiva (Fig. 22B). El efecto de la transfección con *siRNAs* dirigidos contra las subunidades  $\text{Na}_v\beta 1$  y  $\text{Na}_v\beta 2$  se reflejó en un aumento de aproximadamente 35% en la capacidad invasiva de las células CaSki. Por su parte, las células transfectadas con el canal  $\text{Na}_v 1.6$  mostraron un incremento similar ( $\sim 35\%$ ) en el número de células invasivas. Dicho aumento no fue significativo cuando las células se incubaron en presencia del bloqueador de canales  $\text{Na}_v$  (1  $\mu\text{M}$  TTX). Finalmente, las dos condiciones Control incluidas en estos experimentos no produjeron cambios significativos en la capacidad de migración de las células CaSki (Fig. 22B).

Con el propósito de obtener más evidencias respecto a los resultados de migración e invasividad presentados en la Fig. 22 se realizaron dos series de experimentos adicionales. En primer lugar, experimentos electrofisiológicos mediante la técnica de *patch clamp* para determinar la presencia de corrientes de sodio funcionales en las células transfectadas con el canal  $\text{Na}_v 1.6$  y en segundo lugar, células CaSki sometidas al tratamiento con *siRNAs* fueron procesadas para ensayos de inmunocitoquímica con el propósito de evaluar la expresión de la proteína de las subunidades  $\text{Na}_v\beta 1$  y  $\text{Na}_v\beta 2$ , así como sus posibles cambios en respuesta a los tratamientos con los RNAs de interferencia.

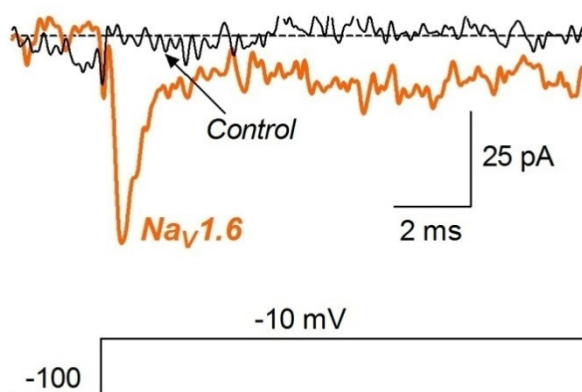
#### **6.3.4. Registro de corrientes de sodio en células CaSki transfectadas con el canal $\text{Na}_v 1.6$**

Los cultivos de células CaSki cotransfectadas con el canal  $\text{Na}_v 1.6$  y el vector de expresión de la proteína GFP presentaron una eficiencia de transfección de aproximadamente el 70% (Fig. 23).

Las células con fluorescencia fueron seleccionadas para los registros de *patch clamp* y de un total de 6 células, en 5 de ellas se registraron corrientes de sodio en respuesta a pulsos despolarizantes a -10 mV (trazo naranja, Fig. 24). La amplitud promedio de la corriente de sodio fue de  $39 \pm 9$  pA ( $n = 5$ ). Como ya se mencionó anteriormente, las células CaSki no transfectadas (Control) no presentaron evidencias de corrientes de sodio (trazo negro, Fig. 24). La presencia de estas corrientes en las células CaSki transfectadas con el canal  $\text{Na}_v1.6$  es consistente con los resultados de invasividad de la Fig. 22.



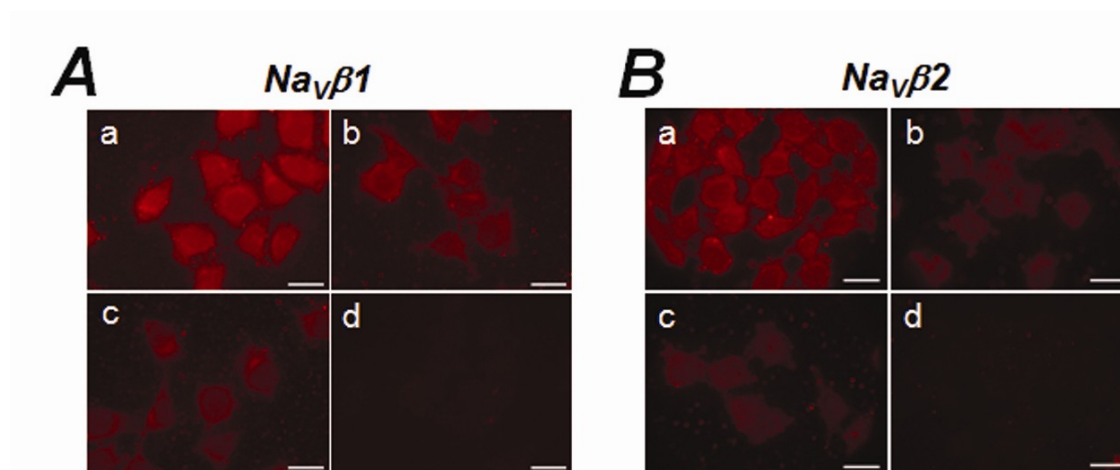
**Figura 23. Expresión de GFP en células CaSki transfectadas con el canal  $\text{Na}_v1.6$ .** Se muestra la fluorescencia de células CaSki cotransfectadas con el vector que codifica a la GFP y el vector de expresión del canal  $\text{Na}_v1.6$  a las 24 h post-transfección (A), y las mismas células en campo claro (B). La eficiencia de transfección fue de aproximadamente 70%. Fotografías tomadas en un microscopio invertido Nikon TE2000-U equipado con una cámara (Digital Sight DS-2M, Nikon), y equipo de epifluorescencia con un filtro B-2E/C, cuya longitud de onda central es de 535 nm. Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ .



**Figura 24. Corriente de sodio activada por voltaje en células CaSki transfectadas con el canal  $\text{Na}_v1.6$ .** Registro representativo de la corriente de sodio registrada a -10 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -100 mV en una célula CaSki transfectada con el canal  $\text{Na}_v1.6$  (trazo naranja). Aunque la amplitud de la corriente es pequeña, la rapidez con la que alcanza su valor máximo (activación) y regresa a un valor muy cercano a cero (inactivación), son características propias de los canales de sodio (ambos procesos ocurren en poco menos de 2 ms). Para fines de comparación también se presenta el registro correspondiente obtenido de una célula CaSki Control (no transfectada; trazo negro). La línea negra punteada indica el nivel cero (basal) de corriente. mV: mili voltios; ms: mili segundos; pA: pico Amperios.

### 6.3.5. Inmunodetección de las subunidades $Na_v\beta 1$ y $Na_v\beta 2$

Mediante el empleo de anticuerpos específicos dirigidos contra las subunidades  $\beta$  de interés se determinó la presencia de la proteína de las subunidades  $Na_v\beta 1$  y  $Na_v\beta 2$  en células CaSki y sus posibles cambios debidos al tratamiento con *siRNAs* para dichas subunidades. Como control positivo se utilizaron células CaSki que recibieron el mismo tratamiento pero en ausencia de *siRNAs*, mientras que el control negativo consistió de células CaSki que fueron procesadas de igual manera pero sin incluir el anticuerpo primario en la tinción. Los resultados muestran que tanto la proteína de  $Na_v\beta 1$  como la de  $Na_v\beta 2$  se encuentran presentes en las células CaSki, y ambas sufren una disminución aparente en su expresión después de tratar las células CaSki con *siRNAs* dirigidos contra la subunidad correspondiente por 24 y 48 horas (Fig. 25). Estos resultados sugieren que no obstante que la migración de las células CaSki tratadas con *siRNAs* durante 48 h disminuyó respecto a lo observado a las 24 h, dicha observación no puede explicarse por una falta de efecto de los *siRNAs* sobre la expresión de la proteína, ya que los niveles aparentes de éstas permanecen disminuidos respecto al control.



**Figura 25. Inmunorreactividad de  $Na_v\beta 1$  y  $Na_v\beta 2$  en células CaSki.** Microfotografías que muestran la inmunofluorescencia emitida por el anticuerpo secundario (Alexa Fluor 647) indicando la presencia de la subunidad  $Na_v\beta 1$  (**A**) y  $Na_v\beta 2$  (**B**). En cada caso, panel (a): transfección sin *siRNA*, (b) transfección con *siRNA* durante 24 h; (c) transfección con *siRNA* durante 48 h; y (d) transfección sin *siRNA* 24 h, donde no se incluyó el anticuerpo primario en la reacción. Para ambas proteínas se observa una disminución en la inmunorreactividad de la proteína a los dos tiempos de incubación. Barra de calibración: 20  $\mu m$ .

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1. Expresión de canales $\text{Na}_v$ en líneas celulares de CaCu

Previamente nuestro grupo de investigación reportó la expresión funcional de canales  $\text{Na}_v$  en biopsias y cultivos primarios de CaCu, tanto a nivel de mensajero como a nivel de la proteína funcional (Diaz et al., 2007). Más recientemente, nuestro laboratorio también reportó que el canal de sodio  $\text{Na}_v1.6$  se sobre expresa (en más de 5 veces) en las muestras de CaCu positivas a VPH-16 y VPH-18, con respecto al tejido cervical no canceroso; además la actividad de los canales  $\text{Na}_v1.6$  contribuyó a la capacidad invasiva de las células de CaCu (Sánchez-Sandoval, 2011; Hernandez-Plata et al., 2012). Bajo la luz de tales observaciones resulta de gran importancia investigar la posible expresión de los canales  $\text{Na}_v$  en líneas celulares derivadas de CaCu, lo cual permitirá determinar la generalidad de dichas observaciones y poder estudiar la participación de los canales  $\text{Na}_v$  en la biología del CaCu con las ventajas que ofrecen las líneas celulares, entre otras la fuente ilimitada de muestra biológica, así como su fácil manejo y mantenimiento.

En una primera aproximación se investigó mediante RT-PCR de punto final la expresión del mensajero de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los canales  $\text{Na}_v$  en las líneas celulares CaSki, SiHa, CaLo HeLa e INBL, todas ellas derivadas de CaCu. Los resultados mostraron una expresión muy pobre del mensajero de las subunidades  $\alpha$  de los canales de sodio que generan las corrientes de este ión (Fig. 10A). Lo anterior sugiere fuertemente la ausencia de la proteína de los canales de sodio en la membrana plasmática de las líneas celulares de CaCu estudiadas, lo cual fue corroborado con experimentos electrofisiológicos utilizando la técnica de *patch clamp* que demostraron la inexistencia de corrientes de sodio activadas por voltaje en tales células (Fig. 11). El hecho de que ninguna de las líneas celulares genere corrientes de sodio activadas por voltaje resultó un tanto inesperado considerando que en cultivos primarios de este cáncer ya se ha reportado la expresión funcional de estos canales mediante el registro de corrientes de sodio (Diaz et al., 2007). Probablemente la expresión de estos canales en las líneas celulares haya sido suprimida debido a las condiciones de cultivo, la edad de los cultivos (número de pases) o la ausencia de señales extracelulares que de forma natural se presentan en los tumores. Es por ello que se decidió explorar la posibilidad de que la expresión funcional de los canales  $\text{Na}_v$  fuera regulada

por señales hormonales tales como el estradiol o el factor de crecimiento epidermal, lo cual cobra sentido si tomamos en cuenta que el cuello uterino se encuentra frecuentemente expuesto a estos dos factores extracelulares.

## **7.2. Efecto del estradiol y EGF en la expresión de los canales $Na_v$**

En la literatura existen datos contradictorios en cuanto a la expresión de los receptores de estrógenos en las líneas celulares de CaCu (con excepción de HeLa, para la que todos los trabajos coinciden en que no expresa estos receptores), por ello en el presente trabajo se investigó la presencia del mensajero de  $ER\alpha$  y  $ER\beta$  en estas células por medio de RT-PCR de punto final. Para nuestra sorpresa, en todas las líneas celulares, incluyendo a HeLa, se obtuvo un amplicón específico, cuya identidad molecular fue constatada por secuenciación automática del DNA respectivo (Figs. 15 y 16). Sin embargo, la presencia del mRNA no implica necesariamente que se esté generando la proteína funcional. Es probable que no se genere la proteína, o bien que se generen variantes truncas o mutantes no funcionales que no respondan al tratamiento con estradiol, ya que tanto para el  $ER\alpha$  como para el  $ER\beta$ , los *primers* utilizados en el presente trabajo amplifican la zona cercana al extremo amino, mientras que el extremo carboxilo contiene el sitio de unión a ligando, que pudiera ser el que se encuentre truncado o mutado (Nilsson & Gustafsson, 2011). Por lo tanto, para determinar la presencia de receptores a estrógenos funcionales en las líneas celulares de CaCu se realizaron ensayos de actividad estrogénica nuclear (Fig. 16), los cuales demostraron que únicamente las células CaSki son capaces de responder de manera significativa al tratamiento con estradiol, indicando que estas células expresan receptores nucleares funcionales a estrógenos. Con base en esta observación, las células CaSki fueron elegidas para investigar la posible expresión funcional de los canales  $Na_v$  en respuesta al tratamiento con estradiol, sin embargo los resultados obtenidos utilizando la técnica de *patch clamp* mostraron que no hubo expresión de corrientes de sodio activadas por voltaje al incubar a estas células en presencia de estradiol hasta por 48 horas.

Previamente se había reportado que las células CaSki expresan receptores del factor de crecimiento epidermal (Castrilli et al., 1997), por lo que decidimos utilizar estas células para

investigar el posible efecto de este factor en la expresión de canales  $Na_v$  (después de incubaciones de hasta 48 horas con 50 nM de EGF), no obstante, tampoco en este caso se encontraron indicios de corrientes de sodio activadas por voltaje. En contraste, existen reportes en la literatura de que el EGF aumenta la expresión y actividad de los canales  $Na_v$  en líneas celulares de cáncer de próstata (Ding et al., 2008), en células epiteliales de la mucosa gástrica (Wu et al., 2008), y en menor grado en células tumorales de la médula adrenal (Fanger et al., 1995; Toledo et al., 1995).

Existen múltiples factores genéticos y ambientales que pueden estar involucrados en la regulación de la expresión de los canales  $Na_v$  en las líneas celulares de CaCu. En el proceso de generación de las líneas celulares, las células sufren una serie de cambios genéticos debido a la manipulación directa de algunos genes, aunado a posibles cambios que se ocasionan a lo largo del tiempo como consecuencia del número de pases de los cultivos, así como por las condiciones del medio en el cual son incubadas (para una revisión véase Brackenbury, 2012). Es probable que la modificación de uno solo de los componentes presentes en el medio no sea suficiente para que se lleve a cabo un cambio en la expresión de los canales  $Na_v$  en estas células, o bien que un factor o condición experimental diferente a las exploradas en el presente trabajo sea la causa de la ausencia de corrientes de sodio. Huelga decir que es necesario realizar más experimentos para resolver esta incógnita.

### **7.3. Participación de las subunidades $\beta$ en la capacidad invasiva y de migración de células CaSki**

Independientemente del factor o condición responsable de la ausencia de canales de sodio funcionales en la membrana plasmática de las líneas celulares de CaCu estudiadas en la presente disertación, la observación de que el mensajero de las subunidades auxiliares  $\beta$ , por el contrario, se encuentra dentro de los niveles considerados para genes moderadamente expresados (Fig. 19), representa una circunstancia un tanto inesperada, pero bastante interesante al mismo tiempo. La primera interpretación de tales resultados es la probabilidad de que estas subunidades desempeñen en las células de CaCu una función independiente a la clásica regulación que ejercen sobre la subunidad  $\alpha$  de los canales  $Na_v$  (es decir, modulando las

propiedades de tráfico y biofísicas de esta última). De hecho, en algunos trabajos se ha sugerido que las funciones que desempeñan las subunidades  $\beta$  de forma independiente a las subunidades  $\alpha$  podrían ser más importantes que aquellas relacionadas con la modulación de la actividad del canal (Malhotra et al., 2002). Lo anterior nos motivó a investigar la posible relación entre la expresión de las subunidades  $\beta$  y la capacidad invasiva de las líneas celulares, cuya relación ya ha sido reportada previamente en otros tipos de cáncer (Diss et al., 2008; Fraser et al., 2010; Jansson et al., 2012).

Los resultados del presente trabajo mostraron que mediante el tratamiento con *siRNAs* dirigidos contra las subunidades  $\text{Na}_v\beta 1$  y  $\text{Na}_v\beta 2$  se obtiene una reducción significativa en los niveles de expresión del mensajero de ambas subunidades (Fig. 20), lo cual se refleja como una disminución relativa en la cantidad de proteína en las células CaSki (Fig. 25). De mayor relevancia funcional resultó el hecho de que el silenciamiento de las subunidades  $\text{Na}_v\beta 1$  y  $\text{Na}_v\beta 2$  indujo una disminución en la capacidad de migración de las células CaSki a las 24 h y un aumento en invasividad a las 48 h (Fig. 22). La máxima disminución en la migración (20%) se observó al bloquear la expresión de  $\text{Na}_v\beta 2$ , mientras que con el bloqueo de la subunidad  $\text{Na}_v\beta 1$  la reducción en este comportamiento celular fue más discreto (15%). No obstante que ambos porcentajes no fueron estadísticamente diferentes entre ellos, la tendencia de la subunidad  $\text{Na}_v\beta 2$  a producir un mayor efecto inhibitorio sobre la migración podría deberse a la mayor eficacia de los *siRNAs* respectivos para abatir la expresión del mensajero de dicha subunidad comparada con la de los de la subunidad  $\text{Na}_v\beta 1$  (Fig. 20). Aunado a ello, la expresión relativa del mensajero de  $\text{Na}_v\beta 2$  fue casi el doble en comparación con el de  $\text{Na}_v\beta 1$  (Fig. 19A y B; el valor de  $C_T$  para  $\text{Na}_v\beta 2$  fue una unidad más pequeño que el de  $\text{Na}_v\beta 1$ ). Lo anterior sugiere un papel relevante de  $\text{Na}_v\beta 2$  en la migración, sin embargo debido a que los *siRNAs* dirigidos contra  $\text{Na}_v\beta 1$  sólo disminuyeron 35% la cantidad del mensajero, (con los de  $\text{Na}_v\beta 2$  se obtuvo una reducción de más del 90%; Fig. 20), no se puede descartar que la subunidad  $\text{Na}_v\beta 1$  contribuya en igual medida a la migración de las células CaSki.



Es importante hacer notar que los efectos sobre la migración fueron significativos únicamente 24 h después de que las células fueron transfectadas con los *siRNAs*; cuando los ensayos de migración se realizaron 48 h después de la transfección el efecto ya no fue significativo (Fig. 22A). Una posible explicación a estos resultados es que los niveles de los *siRNAs* en las células CaSki transfectadas decaiga significativamente después de 24 h, sin embargo, los niveles de mRNA y de la proteína para las subunidades  $\text{Na}_v\beta 1$  y  $\text{Na}_v\beta 2$  (Fig. 25) permanecen disminuidos hasta las 48 h después de la transfección. Interesantemente, otros trabajos de investigación han reportado los efectos del abatimiento de la expresión de estas subunidades en periodos más largos de tiempo, de 3 a 8 días (Deschenes et al., 2008; Chioni et al., 2009; Mishra et al., 2011; Jansson et al., 2012). Por lo tanto, es probable que las células CaSki activen algún mecanismo como respuesta al abatimiento en la expresión de subunidades  $\beta$  que le permitan recuperar la capacidad de migración, incluso cuando la expresión de la proteína no haya regresado a niveles normales.

Por otra parte, el abatimiento en la expresión de  $\text{Na}_v\beta 1$  y  $\text{Na}_v\beta 2$  no tuvo efectos aparentes en la capacidad invasiva de las células CaSki a las 24 h de tratamiento con los *siRNAs* (tiempo al que se observa una disminución en la migración), en claro contraste, después de 48 h de la transfección con *siRNAs* sí se detectó un aumento considerable y significativo de alrededor del 30% en la capacidad invasiva de las células CaSki (Fig. 22B), es decir, al mismo tiempo que la capacidad de migración regresó a sus niveles basales (Fig. 22A). En otras palabras, la disminución de la expresión de las subunidades  $\text{Na}_v\beta 1$  y  $\text{Na}_v\beta 2$  reduce primeramente el número de células que pueden migrar, para después activar un mecanismo de compensación que les permite a las células CaSki aumentar su capacidad invasiva. Esta aparente contradicción entre los efectos observados en la capacidad de migración y de invasividad de las células CaSki (ya que es razonable suponer que para que haya invasividad debe haber migración), plantea la posibilidad de mecanismos distintos en el comportamiento invasivo de las células de CaCu, concretamente de las células CaSki. Es posible que en estas células el papel de las subunidades  $\beta$  de los canales  $\text{Na}_v$  en la adhesión celular consista de dos fases, una en la que las células disminuyen su capacidad de migrar y se “preparan” para posteriormente (después de 24 h) aumentar significativamente su capacidad invasiva (en la fase dos). En dicha fase de “preparación”, las células podrían aumentar los niveles de algunas metaloproteinasas (MMP-2, MMP-9 y MT1-

MMP) que se han asociado a la capacidad invasiva de las células CaSki (Cardeal et al., 2006; Cardeal et al., 2012) y en la progresión e invasión del CaCu (Brummer et al., 2002; Shen et al., 2003; Gaiotto et al., 2004; Zhai et al., 2005). Sin embargo, los resultados del presente trabajo no permiten establecer una correlación directa entre ambas observaciones, por lo que se requieren más estudios encaminados a dilucidar el mecanismo por el cual el abatimiento de las subunidades  $\text{Na}_v\beta_1$  y  $\text{Na}_v\beta_2$  se traduce en una disminución inicial en la migración, seguida de un aumento en la capacidad invasiva de las células CaSki.

Además de las características que presentan las subunidades  $\beta$  como moléculas de adhesión y como moduladoras de la actividad de los canales  $\text{Na}_v$ , se ha sugerido que también pueden realizar funciones de regulación transcripcional. De esta manera se ha descrito que la subunidad  $\text{Na}_v\beta_2$  sufre un corte por  $\gamma$ -secretasas generando dominios intracelulares solubles que se pueden translocar al núcleo celular (Kim et al., 2005) y a su vez producir un aumento en la cantidad de mensajero del canal  $\text{Na}_v1.1$  (Kim et al., 2007). Esto abre la posibilidad de que la transcripción de otras proteínas también sea regulada por las subunidades  $\beta$  de los canales  $\text{Na}_v$ , y probablemente algunas de éstas estén relacionadas con la capacidad invasiva o de migración. Es evidente que aún queda mucho por conocer sobre las funciones de estas proteínas.

#### **7.4. Participación de $\text{Na}_v1.6$ en la capacidad invasiva de células CaSki**

Previamente nuestro grupo de trabajo reportó que el bloqueo de la actividad de los canales  $\text{Na}_v$ , y específicamente el canal  $\text{Na}_v1.6$ , produce una disminución en la capacidad invasiva de cultivos primarios de CaCu (Hernandez-Plata et al., 2012). Dicho antecedente y la observación en el presente trabajo de la ausencia de corrientes de sodio activadas por voltaje en las células CaSki nos motivó a transfectar estas células con el canal  $\text{Na}_v1.6$  e investigar su posible efecto sobre la invasividad de dichas células de CaCu. En concordancia con este razonamiento, la expresión de dicho canal produjo un aumento sustancial en la capacidad invasiva (mayor al 35%) de las células CaSki, además dicho efecto fue prevenido por la incubación de las células en presencia de la toxina TTX (1  $\mu\text{M}$ ; Fig. 22B). Lo anterior confirma la participación del canal  $\text{Na}_v1.6$  en la capacidad invasiva de las células de CaCu. Aunque la sobre expresión de canales  $\text{Na}_v$  en las propiedades

invasivas de líneas celulares de cáncer de próstata ha sido descrito previamente (Bennett et al., 2004), a la fecha no existe un mecanismo definido claramente a través del cual los canales de sodio ejercen tales efectos (para una revisión véase Brackenbury, 2012).

Adicional a la aportación sobre el avance en el entendimiento de la biología del CaCu, los resultados del presente trabajo de tesis son novedosos ya que es la primera vez que se reporta la participación de las subunidades  $\beta$  de los canales  $\text{Na}_v$  en la capacidad de migración e invasividad de las líneas celulares de cáncer cervicouterino. Estos resultados a su vez ubican a las subunidades  $\text{Na}_v\beta_1$  y  $\text{Na}_v\beta_2$  como potenciales blancos para la prevención terapéutica de la metástasis del cáncer cervicouterino.

## 8. CONCLUSIONES

1. Las líneas celulares derivadas de cáncer cervicouterino: CaSki, SiHa, CaLo HeLa e INBL, no expresan canales  $Na_v$  funcionales en la membrana plasmática.
2. El tratamiento de las células CaSki con estradiol o EGF no es suficiente para inducir la expresión funcional de los canales  $Na_v$ .
3. En contraste, todas las líneas celulares de CaCu estudiadas presentaron niveles moderados de mRNA de las cuatro subunidades  $\beta$  de los canales  $Na_v$ .
4. El abatimiento de la expresión de las subunidades  $Na_v\beta1$  y  $Na_v\beta2$  disminuyó en 15 y 20% respectivamente, la capacidad de migración de las células CaSki. Este efecto se observó únicamente a las 24 h, ya que a las 48 h la diferencia no fue significativa.
5. Por el contrario, la misma condición experimental indujo un aumento significativo (de aproximadamente 35%) sobre la capacidad invasiva de las células CaSki sólo a las 48 h de iniciado el tratamiento, mientras que a las 24 h el efecto no fue significativo.
6. La transfección del canal  $Na_v1.6$  en células CaSki incrementa la capacidad invasiva de éstas en un 35%. Este efecto fue dependiente de la actividad conductora del canal de sodio ya que no se observó en presencia de la TTX, bloqueador específico de los canales  $Na_v$ .
7. A reserva de dilucidar el mecanismo por el cual las subunidades  $Na_v\beta1$  y  $Na_v\beta2$  contribuyen a la capacidad invasiva de las células CaSki, los resultados del presente trabajo sugieren la participación de dichas subunidades en la capacidad metastásica del cáncer cervicouterino.

## 9. REFERENCIAS

- Baselga, J. & Albanell, J.** 2002. Epithelial growth factor receptor interacting agents. *Hematol Oncol Clin North Am* 16:1041-1063.
- Bennett, E.S., Smith, B.A., & Harper, J.M.** 2004. Voltage-gated Na<sup>+</sup> channels confer invasive properties on human prostate cancer cells. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 447:908-914.
- Brackenbury, W.J.** 2012. Voltage-gated sodium channels and metastatic disease. *Channels* 6:352-361.
- Brackenbury, W.J. & Djamgoz, M.B.A.** 2006. Activity-dependent regulation of voltage-gated Na<sup>+</sup> channel expression in Mat-LyLu rat prostate cancer cell line. *Journal of Physiology-London* 573:343-356.
- Brackenbury, W.J. & Isom, L.L.** 2011. Na<sup>+</sup> channel  $\beta$  subunits: overachievers of the ion channel family. *Frontiers in Pharmacology* 2:1-11.
- Brake, T. & Lambert, P.F.** 2005. Estrogen contributes to the onset, persistence, and malignant progression of cervical cancer in a human papillomavirus-transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2490-2495.
- Brisson, L., Gillet, L., Calaghan, S., Besson, P., Le Guennec, J.Y., Roger, S., & Gore, J.** 2011. Na(V)1.5 enhances breast cancer cell invasiveness by increasing NHE1-dependent H<sup>+</sup> efflux in caveolae. *Oncogene* 30:2070-2076.
- Brummer, O., Bohmer, G., Hollwitz, B., Flemming, P., Petry, K.U., & Kuhnle, H.** 2002. MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation - An immunohistochemical study. *Gynecologic Oncology* 84:222-227.
- Caceres-Cortes, J.R., Alvarado-Moreno, J.A., Waga, K., Rangel-Corona, R., Monroy-Garcia, A., Rocha-Zavaleta, L., Urdiales-Ramos, J., Weiss-Steider, B., Haman, A., Hugo, P., Brousseau, R., & Hoang, T.** 2001. Implication of tyrosine kinase receptor and steel factor in cell density-dependent growth in cervical cancers and leukemias. *Cancer Research* 61:6281-6289.
- Caino, M.C., Meshki, J., & Kazanietz, M.G.** 2009. Hallmarks for senescence in carcinogenesis: novel signaling players. *Apoptosis* 14:392-408.
- Cardeal, L.B.D., Boccardo, E., Termini, L., Rabachini, T., Andreoli, M.A., di Loreto, C., Longatto, A., Villa, L.L., & Maria-Engler, S.S.** 2012. HPV16 Oncoproteins Induce MMPs/RECK-TIMP-2 Imbalance in Primary Keratinocytes: Possible Implications in Cervical Carcinogenesis. *Plos One* 7.
- Cardeal, L.B.D., Brohem, C.A., Correa, T.C.S., Winnischofer, S.M.B., Nakano, F., Boccardo, E., Villa, L.L., Sogayar, M.C., & Maria-Engler, S.S.** 2006. Higher expression and activity of metalloproteinases in human cervical carcinoma cell lines is associated with HPV presence. *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie et Biologie Cellulaire* 84:713-719.
- Castrilli, G., Tatone, D., Diodoro, M.G., Rosini, S., Piantelli, M., & Musiani, P.** 1997. Interleukin 1alpha and interleukin 6 promote the in vitro growth of both normal and neoplastic human cervical epithelial cells. *Br J Cancer* 75:855-859.
- Castro Romero, J.I., Hernandez, G.C., & Madrid, M., V.** 2011. Hormonal contraception as a risk factor for developing cervical cancer: biological, epidemiological and immunological evidence. *Ginecol Obstet Mex* 79:533-539.
- Catterall, W.A.** 2011. Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3:1-23.
- Catterall, W.A.** 2012. Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *Journal of Physiology-London* 590:2577-2589.
- Catterall, W.A., Goldin, A.L., & Waxman, S.G.** 2005. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 57:397-409.
- Chapman, W.B., Lorincz, A.T., Willett, G.D., Wright, V.C., & Kurman, R.J.** 1992. Epidermal growth factor receptor expression and the presence of human papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynecol Pathol* 11:221-226.
- Chioni, A.M., Brackenbury, W.J., Calhoun, J.D., Isom, L.L., & Djamgoz, M.B.A.** 2009. A novel adhesion molecule in human breast cancer cells: Voltage-gated Na<sup>+</sup> channel beta 1 subunit. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41:1216-1227.
- de Freitas, A.C., Gurgel, A.P., Chagas, B.S., Coimbra, E.C., & do Amaral, C.M.** 2012. Susceptibility to cervical cancer: an overview. *Gynecol Oncol* 126:304-311.
- Deschenes, I., Armoundas, A.A., Jones, S.P., & Tomaselli, G.F.** 2008. Post-transcriptional gene silencing of KChIP2 and Na(v)beta 1 in neonatal rat cardiac myocytes reveals a functional association between Na and I(to) currents. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 45:336-346.

- Diaz, D., Delgadillo, D.M., Hernandez-Gallegos, E., Ramirez-Dominguez, M.E., Hinojosa, L.M., Ortiz, C.S., Berumen, J., Camacho, J., & Gomora, J.C. 2007. Functional expression of voltage-gated sodium channels in primary cultures of human cervical cancer. *Journal of Cellular Physiology* 210:469-478.
- Diaz, L., Ceja-Ochoa, I., Restrepo-Angulo, I., Larrea, F., Avila-Chavez, E., Garcia-Becerra, R., Borja-Cacho, E., Barrera, D., Ahumada, E., Gariglio, P., Alvarez-Rios, E., Ocadiz-Delgado, R., Garcia-Villa, E., Hernandez-Gallegos, E., Camacho-Arroyo, I., Morales, A., Ordaz-Rosado, D., Garcia-Latorre, E., Escamilla, J., Sanchez-Pena, L.C., Saqui-Salces, M., Gamboa-Dominguez, A., Vera, E., Uribe-Ramirez, M., Murbartian, J., Ortiz, C.S., Rivera-Guevara, C., De Vizcaya-Ruiz, A., & Camacho, J. 2009. Estrogens and human papilloma virus oncogenes regulate human ether-a-go-go-1 potassium channel expression. *Cancer Res* 69:3300-3307.
- Ding, Y.N., Brackenbury, W.J., Onganer, P.U., Montano, X., Porter, L.M., Bates, L.F., & Djamgoz, M.B.A. 2008. Epidermal growth factor upregulates motility of Mat-LyLu rat prostate cancer cells partially via voltage-gated Na<sup>+</sup> channel activity. *Journal of Cellular Physiology* 215:77-81.
- Diss, J.K., Fraser, S.P., Walker, M.M., Patel, A., Latchman, D.S., & Djamgoz, M.B. 2008. Beta-subunits of voltage-gated sodium channels in human prostate cancer: quantitative in vitro and in vivo analyses of mRNA expression. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 11:325-333.
- Fanger, G.R., Jones, J.R., & Maue, R.A. 1995. Differential Regulation of Neuronal Sodium-Channel Expression by Endogenous and Exogenous Tyrosine Kinase Receptors Expressed in Rat Pheochromocytoma Cells. *Journal of Neuroscience* 15:202-213.
- Farias, L.M., Ocana, D.B., Diaz, L., Larrea, F., Avila-Chavez, E., Cadena, A., Hinojosa, L.M., Lara, G., Villanueva, L.A., Vargas, C., Hernandez-Gallegos, E., Camacho-Arroyo, I., Duenas-Gonzalez, A., Perez-Cardenas, E., Pardo, L.A., Morales, A., Taja-Chayeb, L., Escamilla, J., Sanchez-Pena, C., & Camacho, J. 2004. Ether a go-go potassium channels as human cervical cancer markers. *Cancer Research* 64:6996-7001.
- Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D.M. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127:2893-2917.
- Fraser, S.P., Diss, J.K.J., Chioni, A.M., Mycielska, M.E., Pan, H.Y., Yamaci, R.F., Pani, F., Siwy, Z., Krasowska, M., Grzywna, Z., Brackenbury, W.J., Theodorou, D., Koyuturk, M., Kaya, H., Battaloglu, E., De Bella, M.T., Slade, M.J., Tolhurst, R., Palmieri, C., Jiang, J., Latchman, D.S., Coombes, R.C., & Djamgoz, M.B.A. 2005. Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clinical Cancer Research* 11:5381-5389.
- Fraser, S.P., Ozerlat-Gunduz, I., Onkal, R., Diss, J.K., Latchman, D.S., & Djamgoz, M.B. 2010. Estrogen and non-genomic upregulation of voltage-gated Na<sup>+</sup> channel activity in MDA-MB-231 human breast cancer cells: role in adhesion. *J Cell Physiol* 224:527-539.
- Gaiotto, M.A.M., Focchi, J., Ribalta, J.L.C., Stavale, J.N., Baracat, E.C., Lima, G.R., & da Silva, I.D.C.G. 2004. Comparative study of MMP-2 (matrix metalloproteinase 2) immune expression in normal uterine cervix, intraepithelial neoplasias, and squamous cells cervical carcinoma. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 190:1278-1282.
- Gao, R., Shen, Y., Cai, J., Lei, M., & Wang, Z. 2010. Expression of voltage-gated sodium channel alpha subunit in human ovarian cancer. *Oncol Rep* 23:1293-1299.
- Gillet, L., Roger, S., Besson, P., Gore, J., Bougnoux, P., Lecaille, F., Lalmanach, G., & Le Guennec, J.Y. 2008. Voltage-gated sodium channels activity promotes cysteine cathepsins-dependent invasiveness of human cancer cell lines. *Ejc Supplements* 6:71.
- Grimes, J.A., Fraser, S.P., Stephens, G.J., Downing, J.E., Laniado, M.E., Foster, C.S., Abel, P.D., & Djamgoz, M.B. 1995. Differential expression of voltage-activated Na<sup>+</sup> currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro. *FEBS Lett* 369:290-294.
- Gutschner, T. & Diederichs, S. 2012. The hallmarks of cancer A long non-coding RNA point of view. *Rna Biology* 9:703-719.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F.J. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100.
- Han, X.B., Wang, F., Yao, W.X., Liu, Y.Q., Wang, G., & Ma, D. 2006. [Inhibitory effects of tetraethylammonium on proliferation and voltage-gated potassium channels in human cervical carcinoma cell line SiHa]. *Ai Zheng* 25:451-455.
- Hanlon, M.R. & Wallace, B.A. 2002. Structure and function of voltage-dependent ion channel regulatory beta subunits. *Biochemistry* 41:2886-2894.

- Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Strom, A., Treuter, E., Warner, M., & Gustafsson, J.A. 2007. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 87:905-931.
- Heo, M.Y., Salama, S.A., Khatoon, N., Al-Hendy, A., & Au, W.W. 2008. Abrogation of estrogen receptor signaling augments cytotoxicity of anticancer drugs on CaSki cervical cancer cells. *Anticancer Res* 28:2181-2187.
- Hernandez-Plata, E., Ortiz, C.S., Marquina-Castillo, B., Medina-Martinez, I., Alfaro, A., Berumen, J., Rivera, M., & Gomora, J.C. 2012. Overexpression of NaV1.6 channels is associated with the invasion capacity of human cervical cancer. *International Journal of Cancer* 130:2013-2023.
- Hille, B. 2001. Ion Channels of Excitable Membranes. 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Horvath, C.A., Boulet, G.A., Renoux, V.M., Delvenne, P.O., & Bogers, J.P. 2010. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology* 7:11.
- 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<sup>+</sup> channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion. *Cancer Res* 70:6957-6967.
- Isom, L.L. 2001. Sodium channel beta subunits: Anything but auxiliary. *Neuroscientist* 7:42-54.
- Isom, L.L., Dejongh, K.S., Patton, D.E., Reber, B.F.X., Offord, J., Charbonneau, H., Walsh, K., Goldin, A.L., & Catterall, W.A. 1992. Primary Structure and Functional Expression of the Beta-1-Subunit of the Rat-Brain Sodium-Channel. *Science* 256:839-842.
- Jansson, K.H., Lynch, J.E., Lepori-Bui, N., Czymmek, K.J., Duncan, R.L., & Sikes, R.A. 2012. Overexpression of the VSSC-associated CAM, beta-2, enhances LNCaP cell metastasis associated behavior. *Prostate* 72:1080-1092.
- Kazen-Gillespie, K.A., Ragsdale, D.S., D'Andrea, M.R., Mattei, L.N., Rogers, K.E., & Isom, L.L. 2000. Cloning, localization, and functional expression of sodium channel beta 1A subunits. *Journal of Biological Chemistry* 275:1079-1088.
- Kim, D.Y., Carey, B.W., Wang, H., Ingano, L.A., Binshtok, A.M., Wertz, M.H., Pettingell, W.H., He, P., Lee, V.M., Woolf, C.J., & Kovacs, D.M. 2007. BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity. *Nat Cell Biol* 9:755-764.
- Kim, D.Y., Ingano, L.A., Carey, B.W., Pettingell, W.H., & Kovacs, D.M. 2005. Presenilin/gamma-secretase-mediated cleavage of the voltage-gated sodium channel beta2-subunit regulates cell adhesion and migration. *J Biol Chem* 280:23251-23261.
- Klein-Hitpass, L., Ryffel, G.U., Heitlinger, E., & Cato, A.C. 1988. A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. *Nucleic Acids Res* 16:647-663.
- Laniado, M.E., Fraser, S.P., & Djamgoz, M.B. 2001. Voltage-gated K(+) channel activity in human prostate cancer cell lines of markedly different metastatic potential: distinguishing characteristics of PC-3 and LNCaP cells. *Prostate* 46:262-274.
- Laniado, M.E., Lalani, E.N., Fraser, S.P., Grimes, J.A., Bhangal, G., Djamgoz, M.B., & Abel, P.D. 1997. Expression and functional analysis of voltage-activated Na<sup>+</sup> channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion in vitro. *Am J Pathol* 150:1213-1221.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. *Methods* 25:402-408.
- Lu, F., Chen, H., Zhou, C., Liu, S., Guo, M., Chen, P., Zhuang, H., Xie, D., & Wu, S. 2008. T-type Ca<sup>2+</sup> channel expression in human esophageal carcinomas: a functional role in proliferation. *Cell Calcium* 43:49-58.
- Malhotra, J.D., Koopmann, M.C., Kazen-Gillespie, K.A., Fettman, N., Hortsch, M., & Isom, L.L. 2002. Structural requirements for interaction of sodium channel beta 1 subunits with ankyrin. *J Biol Chem* 277:26681-26688.
- Mao, J., Chen, L., Xu, B., Wang, L., Wang, W., Li, M., Zheng, M., Li, H., Guo, J., Li, W., Jacob, T.J., & Wang, L. 2009. Volume-activated chloride channels contribute to cell-cycle-dependent regulation of HeLa cell migration. *Biochem Pharmacol* 77:159-168.
- Mariot, P., Vanoverberghe, K., Lalevee, N., Rossier, M.F., & Prevarskaya, N. 2002. Overexpression of an alpha 1H (Cav3.2) T-type calcium channel during neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells. *J Biol Chem* 277:10824-10833.
- Mishra, S., Undrovinas, N.A., Maltsev, V.A., Reznikov, V., Sabbah, H.N., & Undrovinas, A. 2011. Post-transcriptional silencing of SCN1B and SCN2B genes modulates late sodium current in cardiac myocytes from normal dogs and dogs with chronic heart failure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 301:H1596-H1605.

- Moreno, V., Bosch, F.X., Munoz, N., Meijer, C.J., Shah, K.V., Walboomers, J.M., Herrero, R., & Franceschi, S.** 2002. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 359:1085-1092.
- Morgan, K., Stevens, E.B., Shah, B., Cox, P.J., Dixon, A.K., Lee, K., Pinnock, R.D., Hughes, J., Richardson, P.J., Mizuguchi, K., & Jackson, A.P.** 2000. beta 3: An additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:2308-2313.
- Moss, L.A.S., Jensen-Taubman, S., & Stetler-Stevenson, W.G.** 2012. Matrix Metalloproteinases Changing Roles in Tumor Progression and Metastasis. *American Journal of Pathology* 181:1895-1899.
- Munoz, N., Franceschi, S., Bosetti, C., Moreno, V., Herrero, R., Smith, J.S., Shah, K.V., Meijer, C.J., & Bosch, F.X.** 2002. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 359:1093-1101.
- Mycielska, M.E. & Djamgoz, M.B.** 2004. Cellular mechanisms of direct-current electric field effects: galvanotaxis and metastatic disease. *J Cell Sci* 117:1631-1639.
- Mycielska, M.E., Palmer, C.P., Brackenbury, W.J., & Djamgoz, M.B.A.** 2005. Expression of Na<sup>+</sup>-dependent citrate transport in a strongly metastatic human prostate cancer PC-3M cell line: regulation by voltage-gated Na<sup>+</sup> channel activity. *Journal of Physiology-London* 563:393-408.
- Nilsson, S. & Gustafsson, J.A.** 2011. Estrogen Receptors: Therapies Targeted to Receptor Subtypes. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 89:44-55.
- Oguro-Okano, M., Griesmann, G.E., Wieben, E.D., Slaymaker, S.J., Snutch, T.P., & Lennon, V.A.** 1992. Molecular diversity of neuronal-type calcium channels identified in small cell lung carcinoma. *Mayo Clin Proc* 67:1150-1159.
- Ouadid-Ahidouch, H., Chaussade, F., Roudbaraki, M., Slomianny, C., Dewailly, E., Delcourt, P., & Prevarskaya, N.** 2000. KV1.1 K(+) channels identification in human breast carcinoma cells: involvement in cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 278:272-277.
- Ousingsawat, J., Spitzner, M., Schreiber, R., & Kunzelmann, K.** 2008. Upregulation of colonic ion channels in APC (Min/+) mice. *Pflugers Arch* 456:847-855.
- Pardo, L.A., Contreras-Jurado, C., Zientkowska, M., Alves, F., & Stuhmer, W.** 2005. Role of voltage-gated potassium channels in cancer. *J Membr Biol* 205:115-124.
- Payandeh, J., El Din, T.M.G., Scheuer, T., Zheng, N., & Catterall, W.A.** 2012. Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. *Nature* 486:135-U166.
- Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., & Catterall, W.A.** 2011. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* 475:353-U104.
- Prevarskaya, N., Skryma, R., & Shuba, Y.** 2010. Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends Mol Med* 16:107-121.
- Qin, N., D'Andrea, M.R., Lubin, M.L., Shafae, N., Codd, E.E., & Correa, A.M.** 2003. Molecular cloning and functional expression of the human sodium channel beta(1B) subunit, a novel splicing variant of the beta(1) subunit. *European Journal of Biochemistry* 270:4762-4770.
- Roger, S., Besson, P., & Le Guennec, J.Y.** 2003. Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. *Biochim Biophys Acta* 1616:107-111.
- Ruutu, M., Wahlroos, N., Syrjanen, K., Johansson, B., & Syrjanen, S.** 2006. Effects of 17beta-estradiol and progesterone on transcription of human papillomavirus 16 E6/E7 oncogenes in CaSki and SiHa cell lines. *Int J Gynecol Cancer* 16:1261-1268.
- Sánchez-Sandoval, A.L.** 2011. Expresión de canales de sodio en cáncer cervicouterino generado por VPH-18. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México.
- Schiffman, M., Castle, P.E., Jeronimo, J., Rodriguez, A.C., & Wacholder, S.** 2007. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 370:890-907.
- Shen, B.C., Lien, H.C., Ho, H.N., Lin, H.H., Chow, S.N., Huang, S.C., & Hsu, S.M.** 2003. Increased expression and activation of gelatinolytic matrix metalloproteinases is associated with the progression and recurrence of human cervical cancer. *Cancer Research* 63:6537-6542.
- Smith, P., Rhodes, N.P., Shortland, A.P., Fraser, S.P., Djamgoz, M.B., Ke, Y., & Foster, C.S.** 1998. Sodium channel protein expression enhances the invasiveness of rat and human prostate cancer cells. *FEBS Lett* 423:19-24.
- Soonthornthum, T., Arias-Pulido, H., Joste, N., Lomo, L., Muller, C., Rutledge, T., & Verschraegen, C.** 2011. Epidermal growth factor receptor as a biomarker for cervical cancer. *Ann Oncol* 22:2166-2178.



- Stanley, M.** 2010. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecologic Oncology* 117:S5-S10.
- Steben, M. & Duarte-Franco, E.** 2007. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecol Oncol* 107:S2-S5.
- Taylor, J.T., Huang, L., Pottle, J.E., Liu, K., Yang, Y., Zeng, X., Keyser, B.M., Agrawal, K.C., Hansen, J.B., & Li, M.** 2008a. Selective blockade of T-type Ca<sup>2+</sup> channels suppresses human breast cancer cell proliferation. *Cancer Lett* 267:116-124.
- Taylor, J.T., Zeng, X.B., Pottle, J.E., Lee, K., Wang, A.R., Yi, S.G., Scruggs, J.A., Sikka, S.S., & Li, M.** 2008b. Calcium signaling and T-type calcium channels in cancer cell cycling. *World J Gastroenterol* 14:4984-4991.
- Toledoaral, J.J., Brehm, P., Halegoua, S., & Mandel, G.** 1995. A Single-Pulse of Nerve Growth-Factor Triggers Long-Term Neuronal Excitability Through Sodium-Channel Gene Induction. *Neuron* 14:607-611.
- Tsai, T.C. & Chen, S.L.** 2003. The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. *Arch Virol* 148:1445-1453.
- Uysal-Onganer, P. & Djamgoz, M.B.** 2007. Epidermal growth factor potentiates in vitro metastatic behaviour of human prostate cancer PC-3M cells: involvement of voltage-gated sodium channel. *Mol Cancer* 6:76.
- Villa, L.L.** 2011. HPV prophylactic vaccination: The first years and what to expect from now. *Cancer Letters* 305:106-112.
- Wang, X.T., Nagaba, Y., Cross, H.S., Wrba, F., Zhang, L., & Guggino, S.E.** 2000. The mRNA of L-type calcium channel elevated in colon cancer: protein distribution in normal and cancerous colon. *Am J Pathol* 157:1549-1562.
- Weichselbaum, R.R., Hellman, S., Piro, A.J., Nove, J.J., & Little, J.B.** 1978. Proliferation kinetics of a human breast cancer line in vitro following treatment with 17beta-estradiol and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res* 38:2339-2342.
- Weigel, R.J. & deConinck, E.C.** 1993. Transcriptional Control of Estrogen-Receptor in Estrogen Receptor-Negative Breast-Carcinoma. *Cancer Research* 53:3472-3474.
- Woodman, C.B., Collins, S.I., & Young, L.S.** 2007. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7:11-22.
- Wu, W.K.K., Li, G.R., Wong, T.M., Wang, J.Y., Yu, L., & Cho, C.H.** 2008. Involvement of voltage-gated K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> channels in gastric epithelial cell migration. *Molecular and Cellular Biochemistry* 308:219-226.
- Yu, F.H. & Catterall, W.A.** 2003. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol* 4:207.
- Yu, F.H., Westenbroek, R.E., Silos-Santiago, I., McCormick, K.A., Lawson, D., Ge, P., Ferriera, H., Lilly, J., DiStefano, P.S., Catterall, W.A., Scheuer, T., & Curtis, R.** 2003. Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *J Neurosci* 23:7577-7585.
- Zhai, Y., Bommer, G.T., Feng, Y., Wiese, A.B., Fearon, E.R., & Cho, K.R.** 2010. Loss of estrogen receptor 1 enhances cervical cancer invasion. *American Journal of Pathology* 177:884-895.
- Zhai, Y.L., Hotary, K.B., Nan, B., Bosch, F.X., Munoz, N., Weiss, S.J., & Cho, K.R.** 2005. Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase is associated with cervical carcinoma progression and invasion. *Cancer Research* 65:6543-6550.
- Zhang, B., Srirangam, A., Potter, D.A., & Roman, A.** 2005. HPV16 E5 protein disrupts the c-Cbl-EGFR interaction and EGFR ubiquitination in human foreskin keratinocytes. *Oncogene* 24:2585-2588.