



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

CAMPUS UNAM JURIQUILLA

**SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR MEDIADA POR EL RECEPTOR
PURINERGICO P2X7 EN CÉLULAS TUMORALES OVÁRICAS.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

(NEUROBIOLOGÍA)

P R E S E N T A:

Q.F.B. ANGÉLICA SOFÍA MARTÍNEZ RAMÍREZ

DIRECCIÓN DE TESIS:

DR. ROGELIO ARELLANO OSTOA

DR. FRANCISCO GABRIEL VÁZQUEZ CUEVAS

JURIQUILLA, QUERÉTARO. AGOSTO 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado de Examen de Grado certificamos que la tesis elaborada por: Angélica Sofía Martínez Ramírez, cuyo título es: “Señalización intracelular mediada por el receptor purinérgico P2X7 en células tumorales ováricas”, se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente:

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Secretario:

Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas

Vocal:

Dr. Alejandro García Carrancá

Suplente:

Dra. Isabel Méndez Hernández

Suplente:

Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano

Aprobado por el Comité Académico

Dra. María Teresa Morales Guzmán

Coordinadora del Programa

Maestría en Ciencias (Neurobiología)

Este trabajo se realizó en el Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Rogelio Arellano Ostoia y del Dr. Francisco G. Vázquez Cuevas. El proyecto fue apoyado por CONACyT (No. 82340 para ROA y No.166725 para FGVC), PAPIIT-UNAM (No. IN214409 y No. IN205312 para ROA, No. IN208289 para FGVC) e IACOD-UNAM (IA200112 para FGVC). Además, parte de este trabajo fue presentado en las siguientes publicaciones:

Congreso Internacional Cell Signalling Networks:

Martínez-Ramírez AS, Vázquez-Cuevas FG, Garay E, García-Carrancá A, Pérez-Montiel D, Arellano RO. 2011. Intracellular signaling pathways activated by stimulation of the P2X7 receptor in ovarian cancer cells. Abstract. Cell Signaling Networks memories. pp 188.

Artículo de publicación:

Vázquez-Cuevas FG, Garay E, Martínez-Ramírez AS, Cruz-Rico A, García-Carrancá A, Pérez-Montiel D, Arellano RO. Functional expression of P2X7 receptors in ovarian surface epithelium from mouse and human. Enviado.

RESUMEN

El epitelio ovárico superficial (OSE) es una monocapa de células que rodea al ovario donde se ha identificado el origen del 90% de los cánceres ováricos. Los receptores P2X, que son canales catiónicos activados por ATP, se encuentran expresados en las células somáticas ováricas. Se han clonado siete subunidades (P2X1-P2X7) que forman receptores homotríméricos o heterotríméricos. El receptor P2X7 tiene características funcionales que son diferentes a otros miembros de la familia, por ejemplo, su activación no presenta desensibilización, y su apertura prolongada induce sobrecarga de calcio en el citoplasma y la consecuente muerte celular por apoptosis en varios tipos celulares. En el presente trabajo se muestra que P2X7 se expresa en las células del OSE en el ovario humano normal y en adenocarcinomas ováricos. En las células SKOV-3 usadas como modelo de adenocarcinoma ovárico, el análisis del incremento de calcio intracelular generado por la apertura del receptor por el tratamiento con BzATP, un agonista selectivo de P2X7, indicó que la respuesta de P2X7 en SKOV-3 desensibiliza en pocos segundos. El tratamiento con A438079 un antagonista selectivo del receptor P2X7, inhibió la respuesta inducida por BzATP. Asimismo la estimulación del receptor por BzATP indujo la fosforilación de ERK y AKT sin la activación significativa de la caspasa 3. La activación de P2X7 indujo la proliferación de las células SKOV-3. La fosforilación de ERK a través de P2X7 mostró que no depende de un incremento de calcio intracelular, mientras que fue un efecto dependiente de la actividad de cinasa de EGFR.

SUMMARY

Ovarian surface epithelium (OSE) is a single layer of cells surrounding the ovary and it has been identified that 90% of human ovarian cancers originate from this cell layer. The P2X receptors, which are ATP-gated cationic channels, are widely expressed in somatic ovarian cells. To date there are seven known P2X subunits (P2X1-P2X7) that form homotrimeric or heterotrimeric receptors. The P2X7 receptor has functional characteristics that are different from those of other P2X; for example, its activation does not desensitize, and its prolonged aperture can induce Ca^{2+} overload in the cytoplasm and the consequent apoptotic cell death. Here, it is shown that the P2X7 receptor is highly expressed in OSE cells of normal human ovary and preserved in ovarian tumors. In SKOV-3 cells, a human OSE cell line used as a model, analysis of intracellular Ca^{2+} increase induced by the activation of the receptor, using BzATP, a selective agonist of P2X7, revealed that the P2X receptor response desensitized in seconds. It was confirmed that A438079, a selective antagonist of P2X7, inhibited the desensitizing response to BzATP. Also, it was found that P2X7 receptor stimulation induced phosphorylation of ERK and AKT kinases with no significant caspase 3 activation. In this case, remarkably, the intracellular signaling pathways activated may lead to cell proliferation. The effect in ERK phosphorylation was not dependent on intracellular Ca^{2+} , while it was dependent on EGFR kinase activity.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (becaria No: 369701), así como a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (cuenta No: 099210674) por el apoyo económico otorgado durante la realización de este proyecto.

Agradezco al Dr. Rogelio Arellano Ostoia y al Dr. Francisco Vázquez Cuevas, por su apoyo para la realización de este proyecto de investigación y por permitirme ser parte del grupo del laboratorio D-13 del Instituto de Neurobiología de la UNAM.

Agradezco además a la Dra. Carmen Clapp Jiménez Labora y a la Dra. Isabel Méndez Hernández, miembros del comité tutorial, por su valioso apoyo y comentarios en los exámenes tutorales y en la revisión del presente escrito.

A los miembros del jurado: Dr. Mauricio Díaz Muñoz, Dr. Alejandro García Carrancá, Dra. Isabel Méndez Hernández, Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano, por servirse a leer, corregir y comentar este escrito.

Además, agradezco a la Dra. Edith Garay y al Sr. Horacio Benjamín Ramírez Leyva, así como a los demás compañeros del laboratorio D-13 por toda la ayuda moral, técnica y académica que recibí durante la realización de este proyecto.

Agradezco también el apoyo técnico al M.V.Z. Martín García Servín, encargado del bioterio, por la ayuda con los animales de experimentación; a la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos, por su ayuda con las imágenes de microscopía; a la M. en C. Leonor Casanova Rico, por su valiosa ayuda en los trámites administrativos; y a la Dra. Dorothy Pless por su ayuda en la edición de los escritos en inglés.

DEDICATORIAS

A mis padres por ser siempre el motor de mi vida y mi fortaleza.

A mi segunda familia mis tíos Estela y Alejandro.

A mi hermanita Monse.

**A Juanito porque aprendí de fortaleza a tu lado,
gracias por tus bendiciones.**

A mis queridas Chinas.

A los grandes amigos que he encontrado en mi estancia en Querétaro.

A mis amigos del laboratorio D-13 por todo su apoyo.

A mis queridos amigos de la facultad, amigos para toda la vida.

ÍNDICE

RESUMEN.....	iii
SUMMARY.....	iv
AGRADECIMIENTOS	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Ovario y epitelio ovárico superficial	1
1.2. Factores que regulan la fisiología del OSE	3
1.2.1 GnRH, gonadotropinas hipofisarias (LH y FSH) y hormonas esteroideas.....	3
1.2.2 Factores de crecimiento y citocinas	5
1.3. El epitelio ovárico superficial y carcinogénesis	6
1.4. Los receptores purinérgicos P2X.....	10
1.5. El receptor P2X7	12
2. ANTECEDENTES INMEDIATOS	16
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS	23
5.1. Objetivo general	23
5.2. Objetivos particulares	23
6. METODOLOGÍA	24
6.1. Cultivo de células SKOV-3	24
6.2. Experimentos farmacológicos y Western blot	24

6.3.	Dinámica de Ca ²⁺ intracelular	25
6.4.	Ensayos de proliferación celular	25
6.5.	Análisis estadístico.....	26
7.	RESULTADOS.....	27
7.1.	Registros de Ca ²⁺ intracelular.....	27
7.2.	Efecto de la estimulación del receptor P2X7 sobre la activación de las cinasas ERK y AKT.....	29
7.3.	Mecanismos intracelulares involucrados en la fosforilación de ERK por la activación de P2X7	33
7.4.	Efecto en la proliferación celular	38
8.	DISCUSIÓN	40
9.	CONCLUSIONES	49
10.	ESQUEMA DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN PROPUESTA	49
11.	REFERENCIAS.....	50
12.	INDICE DE ABREVIATURAS.....	62
13.	INDICE DE FIGURAS.....	67

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Ovario y epitelio ovárico superficial

El ovario es un órgano que tiene dos funciones primordiales: 1) contiene y regula el desarrollo de las células germinales y 2) produce las hormonas esteroides. Ambos procesos están controlados por las gonadotropinas hipofisarias que tienen sus receptores principalmente en dos tipos de células somáticas en el ovario, las células de la granulosa y de la teca (Gougeon, 2004; Edson et al., 2009). El ovario está rodeado por una capa de células epiteliales que cubre toda la superficie del órgano, esta estructura es el epitelio ovárico superficial (OSE) que es sostenido por una membrana basal (túnica albugínea) sobre el estroma ovárico (Osterholzer et al., 1985; Gougeon, 2004).

El OSE forma una monocapa de células alrededor del ovario. Las células que lo conforman pueden tener una forma cuboidal o formar una columna pseudo-estratificada. Las células del OSE se unen y comunican entre sí por uniones tanto estrechas como comunicantes ("tight-" y "gap- junctions", respectivamente) (Murdoch & McDonnel, 2002).

Las funciones del OSE incluyen el transporte de moléculas hacia el interior y exterior de la cavidad peritoneal y la ruptura y remodelación del ovario durante la ovulación. En los roedores el ovario está rodeado por una cápsula llamada bursa que lleva a cabo la función de comunicar al ovario con la cavidad peritoneal y mantener el microambiente ovárico para que se lleve a cabo la ovulación, la bursa no está presente en humanos (Li et al., 2007). Se han encontrado evidencias que sugieren que este epitelio secreta enzimas proteolíticas de tipo lisosomal durante la ovulación, que son necesarias para degradar la capa de la túnica albugínea y de células de la teca (Bjersing & Cajander, 1975; Kruk et al., 1994). También se ha descrito, que las células del OSE cercanas a los folículos preovulatorios secretan al activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA), y que la ovulación puede ser bloqueada si se agregan anticuerpos anti-uPA (Colgin & Murdoch, 1997).

Otros estudios sugieren que el OSE sufre apoptosis mediada por prostaglandinas en el momento de la ovulación. También se sabe que en este proceso participan citocinas inflamatorias y especies reactivas de oxígeno

producidas durante la ruptura mecánica del folículo (Ackerman & Murdoch, 1993; Wong & Leung, 2007) lo cual favorece que el ovocito pueda ser expulsado del folículo (Bjersing & Cajander, 1975). Después de la ovulación, el OSE se regenera rápidamente por proliferación celular (Auesperg et al., 2001). Se ha propuesto que la capacidad del OSE a proliferar periódicamente es una de las causas por las que éste tipo celular es muy susceptible a sufrir transformación y a desarrollar procesos carcinogénicos (Raghuram et al., 2010).

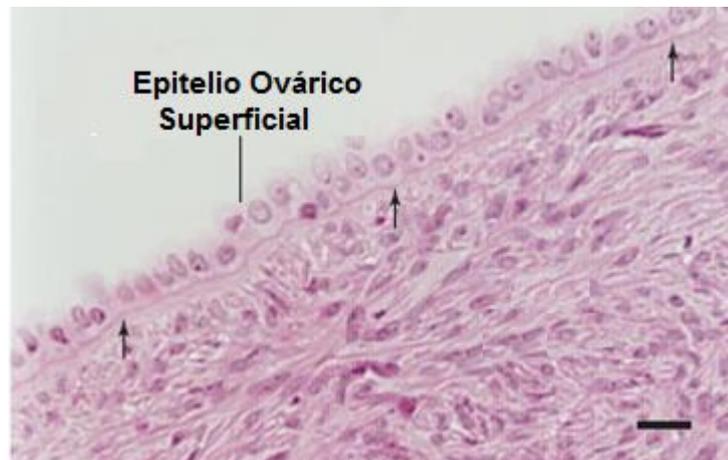


Figura 1.- **Epitelio ovárico superficial en un ovario de bovino**, las flechas marcan el límite del estroma ovárico y la capa de la túnica albugínea, la barra representa 10 μ M (modificada de Murdoch & McDonnel, 2002).

Una característica importante de esta estructura es que expresa marcadores epiteliales y mesenquimales, lo que también ha sido vinculado con su potencial de diferenciación y con su susceptibilidad a la transformación neoplásica (Auersperg et al., 2001). Entre los marcadores de epitelio el OSE expresa las queratinas 7, 8, 18 y 19, N-caderina, el antígeno de mucina MUC1 y la enzima 17- β hidroxisteroide-deshidrogenasa (Auersperg et al., 2001; Osterholzer et al., 1985). Entre los marcadores mesenquimales están la vimentina, las colágenas estromales y proteasas de la matriz extracelular (Vanderhyden et al., 2004).

1.2. Factores que regulan la fisiología del OSE

La mayor parte de la información referente a la regulación de la fisiología del OSE se ha centrado en el conjunto de hormonas que regulan el ciclo reproductivo de las hembras, esto es porque se propone que el OSE tiene un papel importante en el proceso de ovulación que es coordinado por la GnRH, las hormonas gonadotropinas y las esteroides (Osterholzer et al., 1985).

1.2.1. GnRH, gonadotropinas hipofisarias (LH y FSH) y hormonas esteroides

El papel de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) tipo I y tipo II se ha estudiado tras encontrar que estas hormonas se expresan en cultivos primarios de OSE sano y tumoral, así como en líneas celulares inmortalizadas derivadas de este epitelio. Se ha descrito que ambas isoformas de la GnRH tienen un efecto inhibitorio del crecimiento en células del OSE tanto sanas como cancerosas (Kang et al., 2000). Además, la inhibición de la expresión del receptor para la GnRH (GnRHR) mediante RNA de interferencia (SiRNA) previene el efecto citostático de la GnRH, lo que demuestra la acción directa de la GnRH sobre este epitelio. Además, se han propuesto acciones inhibitorias de la GnRH sobre la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I), la inhibición de la actividad de telomerasa, la inducción de inhibidores del ciclo celular como p53 y p21 y la muerte celular apoptótica mediada por la vía Fas/FaL (Wong & Leung, 2007).

El papel de las gonadotropinas en la fisiología de células del OSE es promover la proliferación celular tanto *in vivo* como *in vitro*, lo que correlaciona con la elevada expresión de las hormonas FSH y LH y sus receptores en la etapa peri y post-menopáusica y la propensión a la aparición de tumores ováricos (Auesperg et al., 2001). Sin embargo estos resultados fueron inconsistentes con otros estudios en los que las gonadotropinas fueron ineficientes para promover la proliferación de las células del OSE. Esta contradicción se ha

explicado por la expresión diferencial de los receptores a estas hormonas en distintas etapas del ciclo ovulatorio (Wong & Leung, 2007).

En relación con los efectos de las hormonas esteroides (estrógenos, andrógenos y progesterona) sobre la proliferación de las células del OSE se ha propuesto que son indirectos. Los estrógenos reducen la expresión del receptor de GnRH, e incrementan los niveles del factor de crecimiento hepático (HGF) y del factor de crecimiento epidermal (EGF) lo que se traduce en un efecto positivo sobre la proliferación de las células del OSE (Auesperg et al., 2001).

También se ha descrito que los estrógenos pueden reducir la expresión del receptor de progesterona (PR). La progesterona tiene un papel como inhibidor de la proliferación de estas células. En células de cáncer del endometrio uterino humano el gen que codifica para el receptor de la progesterona se encuentra hipermetilado, resultando en la inhibición de su transcripción y por lo tanto, en la pérdida de la actividad citostática de la hormona. Por otro lado en estudios con células del OSE sanas y cancerosas in vitro, se encontró que la progesterona tiene un papel pro-apoptosis induciendo la vía Fas/FaL y la activación de caspasa-8, los resultados de estos estudios correlacionan con la baja actividad proliferativa del OSE durante el embarazo cuando los niveles de progesterona son elevados (Auersperg et al., 2001).

Respecto a los andrógenos, se ha relacionado la elevada concentración plasmática de estas hormonas en pacientes postmenopáusicas y con síndrome de ovario poliquístico con la alta incidencia de cáncer ovárico, sin embargo no se conoce el mecanismo por el cual los andrógenos estimulan la proliferación celular en el OSE. Se ha propuesto que sus acciones se ejercen de forma indirecta, a través de suprimir el efecto inhibitorio del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) sobre la proliferación de las células del OSE, inhibiendo la expresión de su receptor (Wong & Leung, 2007).

1.2.4. Factores de crecimiento y citocinas

El EGF, ha sido extensamente estudiado en la señalización celular del ovario tanto normal como canceroso.

El EGF se encuentra expresado en las células del OSE tanto *in vitro* como *in vivo* (Rodríguez et al., 1991). Se ha observado que este factor estimula la proliferación de células derivadas del OSE en cultivo y además promueve su des-diferenciación (McClellan et al., 1999; Salamanca et al., 2004). En pocos días de cultivo, se observa que las células en presencia de EGF adquieren una forma alargada y pierden marcadores como la queratina, es decir que adquieren un fenotipo mesenquimal (Siemens & Auersperg, 1988), lo cual refleja la importancia de este factor de crecimiento en la fisiología y patología ovárica, principalmente en procesos tumorales donde se observa un incremento en la proliferación celular. Se ha encontrado también que el TGF α y anferegulina que son análogos a EGF promueven también la proliferación de las células del OSE (Aguilar et al., 1999).

En condiciones fisiológicas, el EGF es secretado, en respuesta a la hemorragia que ocurre posterior a la ruptura folicular, y es liberado del fluido folicular y las plaquetas, lo que le permite a las células del OSE proliferar y llevar a cabo la transición epitelio mesénquima para la remodelación de la superficie ovárica (Auesperg et al., 2001; Wong & Leung 2007).

El receptor de EGF (EGFR) pertenece a la familia ErbB de receptores con actividad de cinasa de tirosina que incluye cuatro isoformas: EGFR, ErbB2, ErbB3 y ErbB4. Cuando el receptor es activado por su ligando se forman dímeros entre los distintos tipos, lo más común es la heterodimerización entre EGFR y ErbB2, que conduce a la fosforilación de cuatro residuos de tirosina en el extremo intracelular responsable de desencadenar la cascada de señalización. ErbB3 no presenta actividad de cinasa, pero activa algunos elementos en la cascada, mientras que el papel de ErbB4 aún no se ha detallado (Phelps et al., 2008). Una vez que el EGFR se fosforila, puede activar varias vías mitogénicas como las vías de las MAP cinasas (ERK, JNK y p38), la vía de sobrevivencia PI3K/AKT, así como a la fosfolipasa C γ , a la proteína cinasa C y las vía de la cinasa Janus (Jak-STAT) (Citri et al., 2003). Se ha

encontrado mayor expresión de este receptor en células cancerosas que en células del OSE sanas (Wong & Leung, 2007; Zeineldin et al., 2006). Un 48% de los tumores ováricos presentan expresión elevada de EGFR y este aumento correlaciona con la disminución en la supervivencia y la formación de metástasis (Hudson et al., 2009).

El ErbB2 se ha implicado en el pronóstico y tratamiento del cáncer ovárico. En la actualidad, existe gran interés en encontrar fármacos (inhibidores de cinasas de tirosina o anticuerpos) que permitan inhibir la actividad del EGFR, para así disminuir sus efectos mitogénicos en tumores ováricos (Phelps et al., 2008)

Se ha encontrado que otros factores de crecimiento también pueden inducir proliferación de las células del OSE, como el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), el factor de crecimiento de keratinocitos (KGF) y el factor de crecimiento hepático (HGF) (Wong & Leung, 2007) .

Además se ha encontrado la expresión de citocinas en células del OSE específicamente de la IL-1, IL-6, del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y del factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (MG-CSF) (Ziltener et al., 1993). Todos éstos tienen un papel en la regulación del crecimiento y diferenciación folicular en el ovario, pero no se conoce su acción en el OSE. Al respecto, es importante que la expresión de estas citocinas puede ser regulada por gonadotropinas y esteroides sexuales sugiriendo que pueden tener un efecto en la ovulación y en la reparación de la superficie ovárica (Auersperg et al., 2001; Wong & Leung, 2007).

1.3. El epitelio ovárico superficial y carcinogénesis

El 90% de los cánceres de ovario se producen en el OSE. El cáncer ovárico es el padecimiento ginecológico más letal, aproximadamente el 70% de las pacientes presenta metástasis diseminada en la región abdominal (Auersperg et al., 2001). Una de las hipótesis que trata de explicar el papel del epitelio en la carcinogénesis sugiere que la ovulación pudiera ser uno de los procesos que desencadena los cánceres originados en el OSE, esto es por la constante

proliferación de estas células y la consecuente acumulación de mutaciones (Godwin et al., 1993; Testa et al., 1994). Asimismo se ha observado que la prevalencia es mayor en grupos de mujeres que toman inductores de la ovulación en los programas de reproducción asistida y, coincidentemente, los procesos que interrumpen momentánea o definitivamente la ovulación (el embarazo, la menopausia temprana, la lactancia prolongada y el uso de anticonceptivos no estrogénicos) reducen el riesgo de desarrollar tumores ováricos (Murdoch & McDonnell, 2002; Folkins et al., 2009).

En el ovario humano como un proceso normal en cada ovulación, se forman invaginaciones del OSE en la superficie ovárica, llamadas cistos de inclusión, que pueden estar presentes en ovarios de todas las edades pero son más comunes en los ovarios de mujeres postmenopáusicas (Scully, 1995). Los cistos de inclusión son localizados en la corteza en la superficie del ovario, y en éstos las células del OSE toman características similares al epitelio Mulleriano, es decir que presentan una forma columnar y expresan marcadores como CA125 y E-Caderina. En pocos sitios del ovario se encuentra coexpresión de E-caderina con N-caderina, estos sitios están restringidos a regiones donde las células epiteliales asumen formas columnares como es el caso de los cistos de inclusión, la coexpresión de éstas dos moléculas en el OSE humano significa propensión a diferenciación epitelial aberrante y procesos metaplásicos y neoplásicos (Van Niekerk et al., 1993; Kantak & Kramer 1998). Por lo tanto, se propone que los cistos de inclusión son frecuentemente los sitios donde comienza la carcinogénesis ovárica (Auersperg et al., 2001; Vanderhyden et al., 2004) (Figura 2).

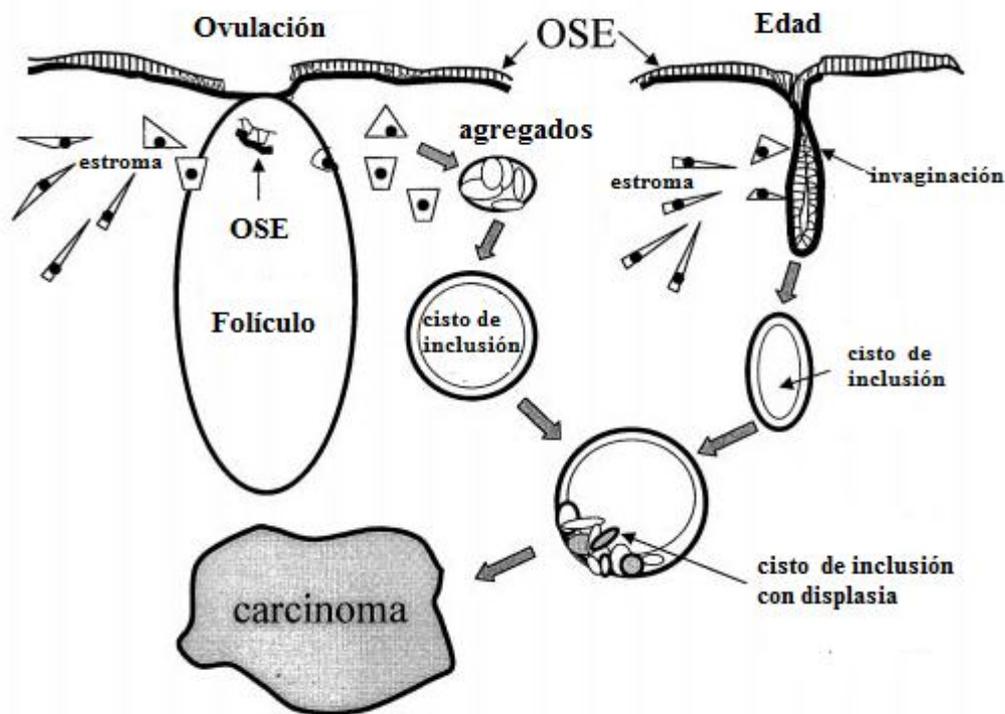


Figura 2.-**Cistos de inclusión como resultado de los procesos de ovulación y por la edad avanzada.** Una de las hipótesis del surgimiento de tumores ováricos es la aparición de cistos de inclusión. Cuando ocurre la ovulación las células del OSE cercanas a un folículo preovulatorio sufren transición epitelio mesénquima para incorporarse al estroma ovárico y permitir la expulsión del ovocito, éstas células pueden volver a su fenotipo epitelial y formar agregados que llevan a la aparición de los llamados cistos de inclusión. Los ovarios de mujeres con edad avanzada presentan con frecuencia invaginaciones de la capa del OSE que pueden también resultar en la formación de cistos de inclusión. (Modificada de Auersperg et al., 2001).

El OSE proviene del epitelio celómico, una capa de células epiteliales derivadas del mesodermo, por este motivo se le denomina como un mesotelio. Sus características fenotípicas y la expresión de moléculas tanto de tipo epitelial como mesenquimal le permiten presentar plasticidad fenotípica, como lo demuestra su capacidad de experimentar la denominada "transición epitelio-mesenquima (EMT)" en respuesta a diferentes condiciones fisiológicas, como por ejemplo, la ovulación (Ahmed et al., 2007). Las células que presentan este proceso de des-diferenciación pierden las moléculas responsables de formar las uniones estrechas entre ellas, pierden también su polaridad por constricción

en su parte apical, se vuelven migratorias por la remodelación de su citoesqueleto y por secreción de proteasas que les permiten romper la membrana basal para migrar a través de la matriz extracelular (Acloque et al., 2009). La EMT tiene un papel importante en la remodelación de la superficie ovárica posterior a la ovulación porque permite la integración de las células del OSE al estroma ovárico. Las células del OSE en cultivo presentan transición epitelio-mesénquima espontáneamente (Auersperg & Woo, 2004; Chang et al., 2009). Este proceso de EMT es también muy importante en la carcinogénesis, en las etapas tempranas de la transformación neoplásica se observa expresión de moléculas epiteliales como la E-caderina y productos de secreción como la Mucina 1 y 4 y CA125, que como ya se mencionó, en el ovario ocurre frecuentemente en los quistes de inclusión. En etapas posteriores la transición de las células del OSE a un fenotipo mesenquimal, induce en éstas células un fenotipo invasivo que permite su diseminación a otros tejidos (Zeineldin et al., 2006; Vanderhyden et al., 2004; Hudson et al., 2008; Leung & Choi, 2007; Okamoto et al., 2009).

La fisiología celular depende del correcto equilibrio proliferación-muerte celular, cuando este equilibrio se ve alterado (por ejemplo por la acumulación de mutaciones como resultado de constantes divisiones celulares, exposición a sustancias carcinogénicas, desregulación de factores epigenéticos o diferenciación celular aberrante) el resultado es la aparición de alteraciones en el control del ciclo celular, que al promover una proliferación constante pueden llevar a la aparición de tumores (Civetta MT & Civetta JD, 2011). En el caso de las células del OSE, en un principio la diferenciación epitelial aberrante las compromete para la formación de tumores, posteriormente su capacidad a cambiar a un fenotipo mesenquimal les confiere la habilidad para diseminarse e invadir otros tejidos.

En carcinomas ováricos se encuentran activas vías de señalización que regulan proliferación celular, y que implican moléculas que pueden favorecer la progresión tumoral como la PI3K/AKT, Src, MAP cinasas (MAPKs) y receptores con actividad de cinasa de tirosina como el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) y ErbB2 (Leung & Choi, 2007). Además, vías que convergen en la activación de las MAPKs y PI3K/AKT pueden ser de gran importancia

para promoverla supervivencia de células tumorales por lo que el estudio de los receptores que activan estas proteínas mitogénicas resulta de interés.

Otro de los factores necesarios para el correcto equilibrio proliferación-muerte celular es la homeostasis iónica intracelular, que depende del paso de iones al interior de la célula a través de receptores tipo canal (Di Virgilio et al., 2009).

1.4. Receptores purinérgicos P2X

Los miembros de la familia de receptores purinérgicos tienen como ligandos endógenos a las purinas (adenosina y ATP principalmente), y son moléculas que regulan procesos fisiológicos a través de diversas vías de señalización, por ejemplo: la contracción del músculo liso, la contracción cardíaca, el transporte epitelial, la respuesta inmunológica, la inflamación, la proliferación celular, la muerte programada, y el control de secreciones tanto endócrinas como exócrinas, entre otras funciones (Ravelick & Burnstock, 1998; Erb et al., 2006; Burnstock, 2006a; Burnstock, 2006b; Coddou et al., 2011).

Los receptores purinérgicos se han clasificado en dos grupos principales, los que son sensibles a adenosina se les denomina receptores P1, y los sensibles a nucleótidos de adenina (ATP, ADP, AMP) que se les denomina de tipo P2 (Burnstock, 1978; Erb et al., 2006). De los receptores del tipo P2, los que forman canales iónicos activados por ligando, se denominan receptores P2X, y los acoplados a proteínas G, receptores P2Y (Burnstock & Kennedy, 1985).

Se han clonado y caracterizado 7 subunidades de los receptores P2X en mamíferos, llamados P2X1 al P2X7 y también han sido descritas varias isoformas de estos. Estas subunidades se oligomerizan en trímeros (homotrímeros o heterotrímeros) para la formación de un receptor-canal. Cada subunidad tiene dos dominios hidrofóbicos que atraviesan la membrana y que son necesarios para la formación del canal, un asa extracelular hidrofílica que contiene 13 glicinas y de 2 a 6 asparaginas como sitios de glicosilación, tienen además 10 cisteínas entre las que se forman puentes disulfuro. El asa extracelular contiene el sitio de unión a ATP y una región hidrofóbica que es importante para la regulación del canal por cationes divalentes como magnesio,

zinc, cobre y otros, finalmente, los extremos amino y carboxilo son intracelulares (North & Surprenant, 2000; Erb et al., 2006) (Figura 3).

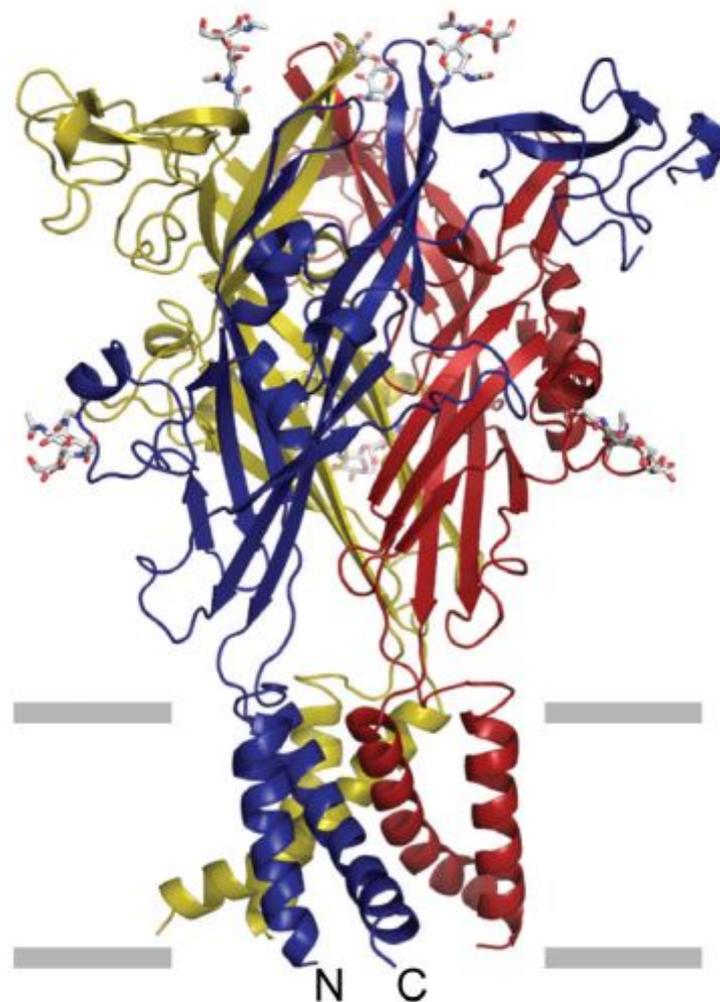


Figura 3.- **Vista de la arquitectura del receptor P2X4 en paralelo con la membrana plasmática.** El receptor P2X4 forma homotrímeros, cada subunidad está representada con un color diferente. Se muestran los sitios de glicosilación en el asa extracelular. Las líneas grises sugieren los límites de la membrana plasmática hacia adentro y hacia afuera de la célula (Modificada de Kawate et al., 2009).

Los receptores de tipo P2X son canales catiónicos que permiten el influjo de Ca^{2+} , Na^+ y el eflujo de K^+ , y provocan respuestas rápidas que producen un incremento de Ca^{2+} intracelular y despolarización (Ravelick & Burnstock, 1998; North & Surprenant, 2000; Gendron et al., 2003; Coddou et al., 2011). El Ca^{2+}

participa en varios eventos intracelulares a través de la activación de MAPKs, PKC y calmodulina (Erb et al., 2006).

1.5. El receptor P2X7

Estructuralmente es similar a otras subunidades, con la excepción de tener un extremo carboxilo terminal más largo (240 aminoácidos) con respecto a otros miembros de esta familia. En general, este tipo de receptor-canal al ser activado no sufre desensibilización, y se mantiene abierto mientras el ligando esté presente. Sin embargo existen algunas variaciones; por ejemplo, el receptor PX7 de la rata presenta una disminución muy lenta de la corriente en la presencia continua del agonista alcanzando una desensibilización máxima en aproximadamente 20 minutos. El receptor P2X7 es inhibido por los cationes divalentes Zn^{2+} y Cu^{2+} y en menor potencia por Mg^{2+} y Ca^{2+} una característica que también es diferente a la de otros receptores P2X (Ravelick & Burnstock, 1998; Liu et al., 2008). La EC_{50} para ATP es de 1 mM y BzATP un agonista sintético, es de 10 a 100 veces más potente que ATP para la activación del canal. Entre los antagonistas de P2X7 se encuentran: PPADS, ATP oxidado, KN-62, BBG y A438079 (Ravelick & Burnstock, 1998; López-Castrejón et al., 2007; Bradley et al., 2011).

El receptor-canal P2X7 presenta algunas características funcionales relevantes. Una de ellas es que su activación induce la formación de una conductancia que permite el flujo de moléculas de hasta 900 Da denominada "megaporo". Se ha propuesto que la activación de esta conductancia involucra el reclutamiento de panexones formados por la panexina 1 (Pelegriin y Surprenant, 2006; Pelegriin, 2011), y se sabe que para esto se requiere de la región carboxilo del receptor (Costa-Junior et al., 2011; Faria et al., 2009; Faria et al., 2010). Dado que esta conductancia no se inactiva, la acumulación de Ca^{2+} activa la maquinaria apoptótica dependiente de la mitocondria (Ferrari et al., 1999). Esta respuesta ha sido documentada en varios tipos celulares como células microgliales, células epiteliales cervicales humanas y células de la teca (Ferrari et al., 1999; Wang et al., 2004; Vázquez-Cuevas et al., 2006).

Como ya se mencionó, el receptor P2X7 tiene un extremo carboxilo terminal más largo que las otras subunidades P2X y se ha propuesto que esta región de

la proteína tiene un papel importante en la función del receptor principalmente regulando vías de señalización intracelulares, interacciones proteína-proteína, modificaciones post-transcripcionales, activación de caspasas, activación de fosfolipasas, regulación del ciclo celular, entre otras funciones (Costa-Junior et al., 2011; Mistafa et al., 2010). La región carboxilo terminal de la variante de humano tiene dos secuencias consenso: 488-492 y 570-574, que son similares al dominio homólogo a Src (SH3) de la proteína GRB2, una proteína adaptadora que participa en la vía de las MAP cinasas (MAPKs), y tiene además una secuencia consenso en 570-579 similar al dominio SH3 de la proteína GADS que está conservada en rata, ratón y humano (Costa-Junior et al., 2011). Estas secuencias pueden funcionar como sitios de interacción proteína-proteína para la señalización intracelular.

Además de las acciones antes mencionadas, recientemente se ha reconocido al receptor P2X7 como un promotor del crecimiento debido a que su activación induce varias vías de señalización mitogénicas (Di Virgilio et al., 2009). En células microgliales el receptor P2X7 es capaz de inducir proliferación celular (Bianco et al., 2006). Efectos similares se han observado en otros tipos celulares, como linfocitos T, linfocitos B de pacientes con leucemia linfocítica crónica y en células K562, LG14 y HEK293 transfectadas con el receptor P2X7 (Di Virgilio et al., 2009; Chou et al., 1998; Amstrup & Novak, 2003; Swanson et al., 1998; Gendron et al., 2003; Bianco, et al., 2006).

Uno de los efectos principales de la activación del receptor P2X7 es la fosforilación de la cinasa ERK, que es un modulador del ciclo celular (Chambard et al., 2007). La vía intracelular por la cual el receptor P2X7 regula la actividad de ERK involucra mecanismos dependientes e independientes del aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} . Por ejemplo, en células de la glándula salival de rata el receptor P2X7 al inducir incrementos en la concentración de calcio puede modular la actividad de la cinasa ERK a través de isoformas dependientes de Ca^{2+} de la proteína cinasa C (PKC), ésta a su vez puede activar a la proteína cinasa D (PKD) y como resultado promover la fosforilación de ERK (Bradford & Soltoff, 2002).

Otro mecanismo por medio del cual la actividad de receptores P2X inducen la fosforilación de ERK involucra a la cinasa de tirosina Pyk2. Se ha descrito que la estimulación de receptores de tipo P2X, específicamente el receptor P2X2, puede llevar a la fosforilación de Pyk2 posterior al incremento en $[Ca^{2+}]_i$. En el caso del receptor P2X7 se han encontrado también efectos en la fosforilación de la cinasa de tirosina Pyk2 (en Y⁴⁰² y Y⁸⁸¹), la fosforilación de Pyk2 en Y⁴⁰² permite la interacción con proteínas como c-Src fosforilada, mientras que la fosforilación en Y⁸⁸¹ resulta en interacciones proteína-proteína incluyendo Grb-2 y PI3K que llevan finalmente a la activación de la vía MAPK/ERK (Swanson et al., 1998).

Por otro lado, se ha descrito que la fosforilación de ERK dependiente de P2X7 puede ser mediada por mecanismos independientes de Ca^{2+} , estas observaciones se realizaron utilizando un modelo de expresión heteróloga en células HEK293, al mismo tiempo se encontró que el efecto en la fosforilación de las cinasas ERK es dependiente del extremo amino terminal del receptor (Amstrup & Novak, 2003). De forma independiente, experimentos utilizando como sistema de expresión células humanas 1321N1 de astrocitoma, se encontró que la fosforilación de ERK depende de una PKC δ que es independiente de Ca^{2+} (Gendron et al., 2003; El-Moatassim & Dubyak, 1992; Sun et al., 1999; Lee et al., 2001).

En otros estudios que complementan estas observaciones, la expresión exógena del receptor P2X7 utilizando como sistema de expresión células HEK293, se observó que la cascada de señalización que conecta a factores de transcripción inducibles por señales extracelulares (Egr-1, NF- κ B o NFAT) con el receptor P2X7 requiere de la transactivación del receptor de EGF, la fosforilación de las cinasas ERK y el incremento de calcio intracelular (Steffano et al., 2007).

Además de regular la actividad de ERK, se ha reportado que el receptor P2X7 activado por su agonista en células de cáncer de pulmón induce la traslocación de AKT al núcleo, esta cinasa es una molécula implicada en la regulación positiva del ciclo celular y negativa de la apoptosis (Mistafa et al., 2010). El papel del receptor en la fosforilación de AKT (S⁴⁷³ y T³⁰⁸) ha sido también

estudiado en otros modelos celulares, por ejemplo en astrocitos y en células de astrocitoma transfectadas con el receptor (Jacques-Silva et al., 2004).

La participación del receptor P2X7 ha sido poco estudiado en el contexto del cáncer. Se ha descrito que en células cancerígenas del epitelio uterino humano el receptor P2X7 se encuentra expresado en menor medida que en células normales; dicho efecto se observó en el mRNA evaluado por RT-PCR en tiempo real encontrándose una disminución de hasta un 85% entre el tejido endometrial y de ectocérvix normal y de cáncer, también se observó una disminución en la cantidad de proteína evaluado por Western blot (Li et al., 2006). Este grupo de trabajo generó la hipótesis de que éste tipo de células desarrollaron algún mecanismo que regula la presencia de este receptor como una estrategia de inhibición de la apoptosis que favorecerá la progresión del tumor, entre éstos mecanismos de regulación de la expresión se propone que el RNA mensajero del receptor es más susceptible a degradación en las células cancerígenas mientras que es más estable en las células normales (Li et al., 2006). Sin embargo, en varios otros tipos de tumores tales como el de próstata, el de mama y el de tiroides se ha reportado la sobre-expresión del receptor (Slater et al., 2004a; Slater et al., 2004b; Solini et al., 2007). La importancia de esta expresión no ha sido explorada, pero la capacidad de P2X7 de inducir apoptosis parece contradictoria con su elevada expresión, es probable que en estos modelos los principales mecanismos de señalización de este receptor converjan en la activación de vías proliferativas y/o de resistencia a la apoptosis.

En modelos de cáncer ovárico no se ha estudiado la expresión y el posible papel fisiopatológico del receptor P2X7 y esta es una de las principales líneas de estudio en nuestro laboratorio.

2. Antecedentes inmediatos

El papel de moléculas señalizadoras como las purinas y pirimidinas extracelulares en el contexto de la fisiología ovárica ha sido estudiado recientemente. Entre los receptores purinérgicos que se han encontrado expresados en las células ováricas hay tanto receptores acoplados a proteínas G como también receptores de tipo canal iónico activado por ligando (Kamada et al., 1994; Arellano et al., 1996; Arellano et al., 1998; Arellano et al., 2002; Arellano et al., 2009; Arellano et al., 2011; Saldaña et al., 2009; Vázquez-Cuevas et al., 2010). En estudios realizados en nuestro laboratorio se ha encontrado que las células del OSE expresan funcionalmente varios receptores purinérgicos, como son P2Y6, P2Y4 y P2Y2 (Lara-Mejía, 2012).

El receptor canal P2X7 también se ha encontrado expresado en células ováricas, de la teca y del OSE. En células de la teca de porcino se encontró que este tipo celular expresa el receptor canal tipo P2X7 (Juárez-Espinosa, 2006) y que su actividad promueve muerte celular apoptótica in vitro por sobrecarga de calcio al interior de la célula (Vázquez-Cuevas et al., 2006). Este mismo efecto citotóxico al administrar altas dosis de ATP se ha observado en varias líneas celulares (Di Virgilio et al., 2009), y también se ha reportado que la activación de este receptor promueve el procesamiento de caspasas en células microgliales, por lo que este efecto está relacionado con apoptosis (Ferrari et al., 1999). Sin embargo se han encontrado también evidencias que sugieren que este receptor puede no solo inducir muerte, sino que también podría activar vías proliferativas como la vía de la MAP cinasa ERK (Panenka et al., 2001; Bradford & Soltoff, 2002; Amstrup & Novak, 2003), y la vía de sobrevivencia PI3K/AKT (Jacques-Silva et al., 2004; Mistafa et al., 2010). Se considera que un mecanismo de transducción de señales importante para este receptor-canal es precisamente la señalización a través del flujo de iones, ya que permite el influjo de Na^+ y Ca^{2+} , que promueven la muerte celular, y del eflujo de K^+ que aparentemente es la señal que induce producción de IL-1 β . Además el Ca^{2+} es un importante segundo mensajero necesario para el funcionamiento de varias enzimas mitocondriales (Di Virgilio et al., 2009). El papel del receptor P2X7 en el OSE, particularmente en el contexto del desarrollo y progresión del cáncer ovárico no ha sido estudiado.

En estudios recientes realizados en nuestro laboratorio se ha analizado la expresión del receptor P2X7 en tumores ováricos humanos. Las células del OSE en estas condiciones muestran hiperplasia e hipertrofia y una expresión abundante del receptor P2X7, que parece estar en contraposición con su actividad proapoptótica. En la figura 4 se muestra la inmunohistoquímica para la detección del receptor P2X7 en biopsias humanas de ovarios sanos y con adenocarcinoma. Estas observaciones abren la posibilidad de que el receptor P2X7 regule aspectos fisiológicos del cáncer ovárico por lo que este proyecto propone analizar el posible papel del receptor en un modelo celular de adenocarcinoma ovárico. Existen varias líneas celulares derivadas de adenocarcinoma ovárico, en el laboratorio se realizaron experimentos enfocados en la funcionalidad de P2X7 utilizando la línea de células de adenocarcinoma ovárico humano derivadas del OSE (SKOV-3), uno de los modelos celulares más conocidos y mejor caracterizados (Auersperg et al., 2001).

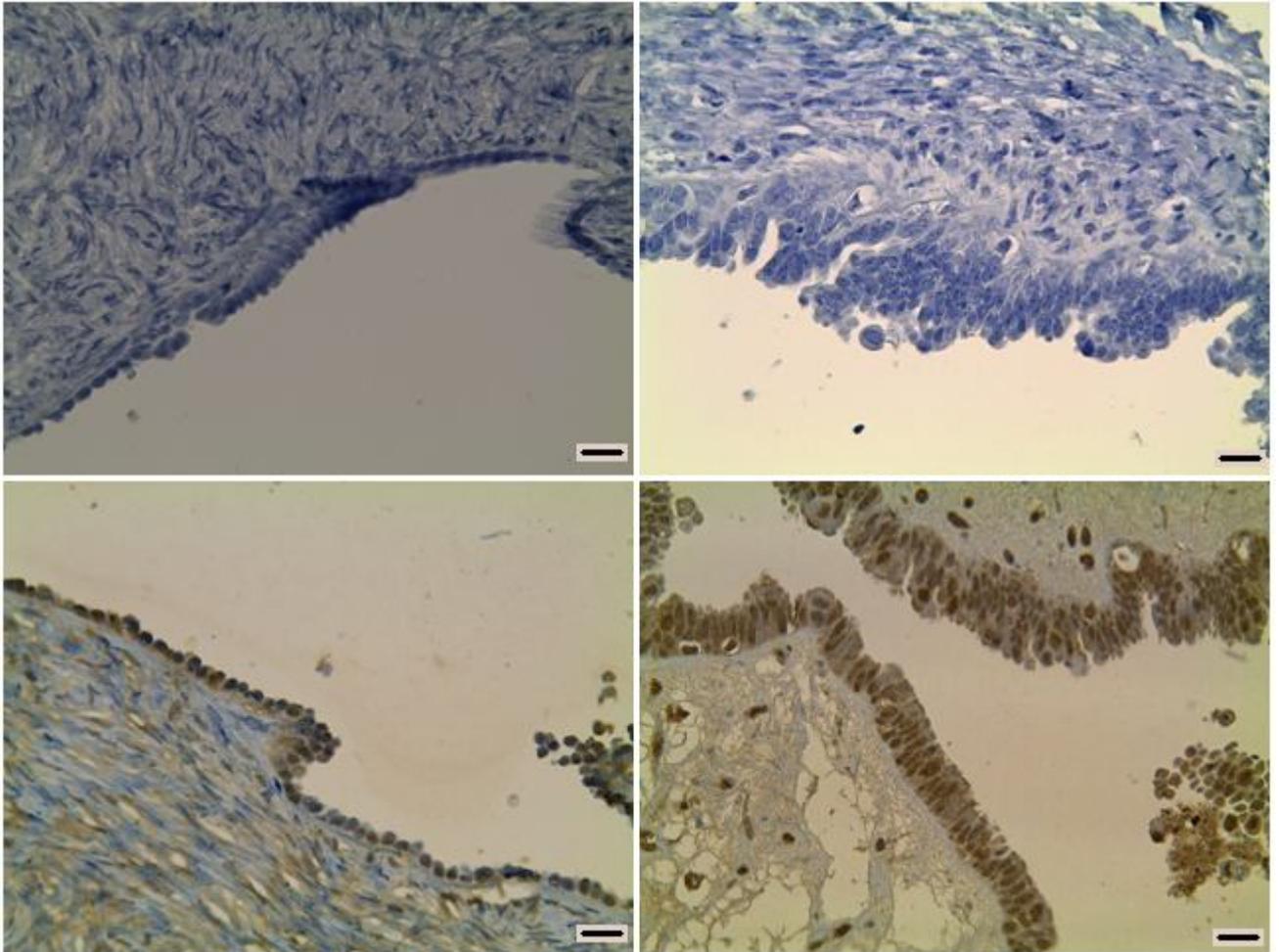


Figura 4.- **Expresión del receptor P2X7 en ovario humano sano y con adenocarcinoma.** Se obtuvieron cortes de 20 μm del tejido incluido en parafina y se realizó tinción con hematoxilina y eosina (paneles superiores) e inmunohistoquímica para el receptor P2X7 (paneles inferiores) en tejido sano (izquierda) y biopsias diagnosticadas como adenocarcinoma (derecha). Amplificación 40X, la barra representa 20 μm .

Para determinar si los receptores P2X7 expresados en el OSE son funcionales se ha estudiado el efecto de la estimulación del receptor P2X7 con el agonista selectivo BzATP, en el incremento de Ca^{2+} intracelular en cultivos primarios de OSE de ratón y en células SKOV-3. La estimulación con el agonista provocó respuestas de incremento de la concentración de calcio intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las células que fueron dependientes de la dosis, y donde las características de la respuesta y su potencia indicaron la participación de un receptor P2X7 (Figura 5).

Una característica funcional del receptor P2X7 es que no se desensibiliza en presencia del agonista (Lara-Mejía, 2012) una respuesta típica de este tipo es ilustrada en la figura 5A, este registro fue obtenido en células del OSE de ratón mantenidas en un cultivo primario y corresponde con la respuesta de las células a la aplicación de BzATP que provocó un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, este aumento se mantiene hasta por 40 segundos. En cambio, cuando el mismo experimento se realizó utilizando células SKOV-3, (Figura 5B), se observó una respuesta rápida de incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} , que disminuyó de forma también rápida a los 10 a 20 segundos, aún en presencia del agonista. Esta atenuación rápida de la respuesta no es el típica para el receptor P2X7 (Lara-Mejía, 2012) y podría revelar diferencias funcionales en el mecanismo de acción del receptor en células cancerosas.

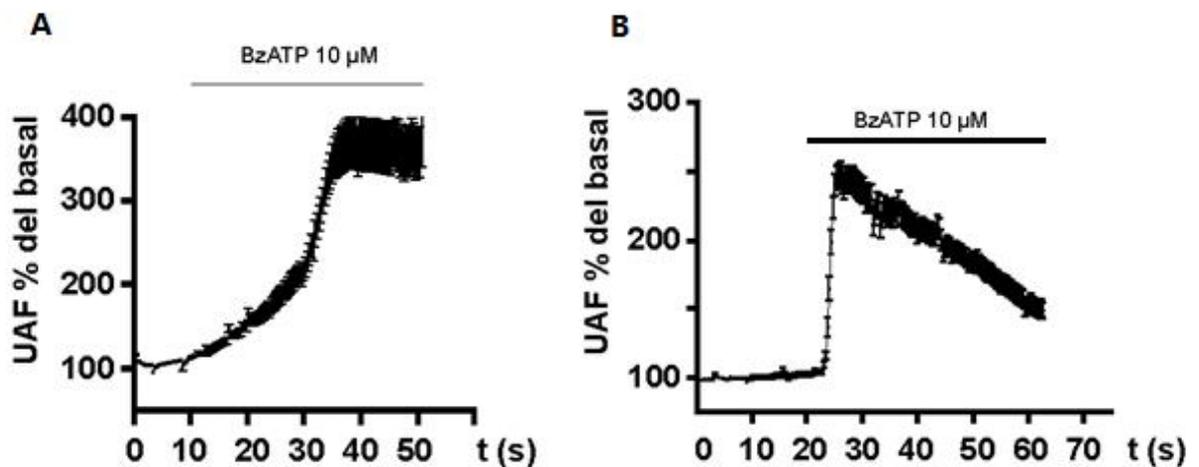


Figura 5.- Incremento de Ca^{2+} intracelular en células derivadas del OSE por la estimulación con BzATP. A) Trazo representativo en células del OSE de ratón estimuladas con BzATP (10 μM), B) en células SKOV-3 estimuladas con BzATP (10 μM).

Por otro lado se sabe que la activación del receptor P2X7 induce muerte celular y promueve el procesamiento de las caspasas ejecutoras (Vázquez-Cuevas et al., 2006, Ferrari et al., 1999). En nuestro laboratorio se ha observado que la

estimulación de células SKOV-3 con el agonista BzATP no induce la proteólisis de la caspasa 3, el estudio por Western blot reveló una sola banda en un peso molecular de aproximadamente 35 KDa que corresponde a la forma no escindida de la caspasa 3 (Figura 6). Este resultado nos sugirió que el receptor P2X7 en células SKOV-3 no promueve apoptosis a través de esta vía, idea que se reforzó por la falta de cambios morfológicos típicos de la muerte por apoptosis. En cambio, el estímulo de las células SKOV-3 por BzATP promovió la activación de ERKs lo que sugirió una interacción con vías mitogénicas.

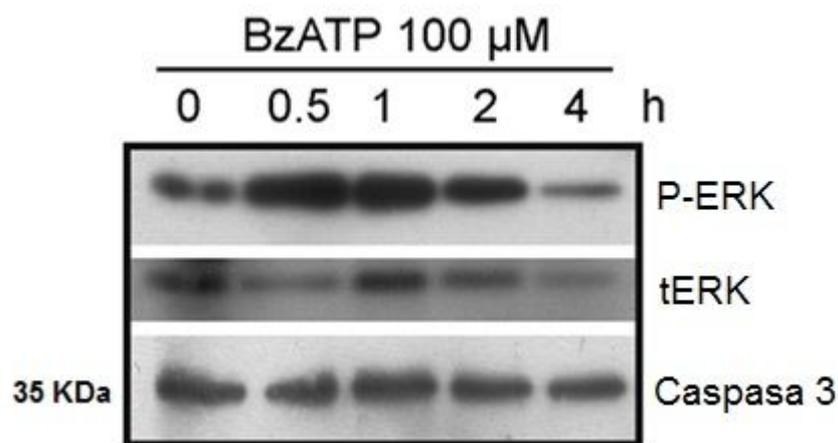


Figura 6.- **BzATP promueve la fosforilación de las ERKs y no induce el procesamiento de la caspasa 3.** Tras la estimulación de las células SKOV-3 con BzATP 100 μM se evaluó por Western blot la presencia de las cinasas ERK en su forma fosforilada (P-ERK) y las proteínas ERK totales (tERK) (paneles superiores), además se evaluó la presencia de los fragmentos de la Caspasa 3 (panel inferior).

3. Justificación

Las características funcionales del receptor-canal P2X7, principalmente su capacidad para inducir muerte celular apoptótica, han llevado a su caracterización en diferentes tejidos tumorales; en algunos casos como en el epitelio del endometrio uterino su disminución se considera un marcador de transformación, sin embargo en otros estudios se ha descrito que no se expresa en tejidos sanos, pero es abundante en el tejido tumoral. En diversos estudios se ha demostrado que además de su papel como canal iónico la activación de P2X7 puede inducir la activación de vías de señalización que regulan el ciclo celular induciendo proliferación, tales como ERK, e inhibición de la apoptosis como PI3K/AKT. Sin embargo, un estudio detallado de estas posibles acciones no se ha realizado en modelos de adenocarcinoma ovárico. Estudios previos de nuestro laboratorio en células SKOV-3 indicaron que la activación de P2X7 no indujo apoptosis, y en cambio promovió la fosforilación de las MAPK-ERK. Las posibles implicaciones de estas acciones celulares y los mecanismos involucrados no se han descrito y serán abordados en este proyecto, esta información puede evidenciar la participación del sistema purinérgico como un elemento regulador en el carcinoma ovárico.

4. Hipótesis

El receptor P2X7 está implicado en la activación de vías de señalización intracelulares de supervivencia y proliferación en células tumorales ováricas.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Determinar el efecto de la activación del receptor P2X7 en la proliferación y las vías de señalización implicadas como, la fosforilación de las MAPK-ERK y AKT, en células de carcinoma ovárico (SKOV3).

5.2. Objetivos particulares

- Determinar farmacológicamente la funcionalidad del receptor P2X7 evaluando el efecto de su activación sobre el incremento de calcio intracelular.
- Evaluar por Western blot el efecto de la activación del receptor P2X7 sobre la fosforilación de las cinasas ERK y AKT.
- Determinar el efecto de la activación del receptor P2X7 sobre la proliferación celular.

6. Métodos

6.1 Cultivo de células SKOV-3

Las células SKOV-3 (ATCC HTB 77 TM) fueron generosamente obsequiadas por el Dr. Alejandro García Carrancá. Las células fueron descongeladas y lavadas con medio DMEM (Gibco) complementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) y antibiótico-antimicótico (anfotericina B, estreptomicina y penicilina, 1X, Gibco). Posteriormente fueron centrifugadas a 500 g por 5 minutos y colocadas en cajas de cultivo de tejidos de 60 X 15 mm. Los cultivos celulares fueron mantenidos en medio DMEM (Gibco) con 10% de suero bovino fetal y antibiótico-antimicótico a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Para los registros de calcio intracelular, las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos de 12 mm y se utilizaron cuando alcanzaron entre 70 y 85% de confluencia. Para los experimentos farmacológicos analizados por Western blot, 5X10⁴ células fueron sembradas en cajas de cultivo de 12 pozos.

6.2. Experimentos farmacológicos y Western blot

Cultivos de células semiconfluentes fueron sometidos a condiciones de privación de suero entre 8 y 10 horas en medio DMEM con el fin de disminuir los valores basales de ERK fosforilada. Transcurrido este tiempo las células fueron incubadas con el tratamiento específico para cada experimento, por ejemplo, con la aplicación de ATP, de BzATP, o del antagonista del receptor A438079 (Sigma), por el tiempo necesario según el experimento a realizar. Después del tratamiento se agregó solución de Laemmli para lisar las células.

Las muestras de proteínas preparadas en el buffer de Laemmli fueron analizadas en geles de acrilamida al 10% en condiciones reductoras. Las proteínas fueron transferidas a membranas de polivinil-difluoruro (PVDF, Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Los sitios inespecíficos en las membranas fueron bloqueados con una solución de leche baja en grasa al 5% (Bio-Rad Laboratories, CA, USA), en TBS-T (Tris base 20mM, NaCl 0.137M, HCl 3.8mM, Tween 20 al 1%), fueron incubadas toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario adecuado (anti ERK fosforilado dilución 1:2000; anti AKT fosforilado dilución 1:1000 o anti ERK total dilución 1:1000, Cell Signaling, MA, USA).

Posteriormente, las membranas fueron lavadas e incubadas con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a HRP (Invitrogen, Co.). Las membranas fueron lavadas y reveladas por autoradiografía con el reactivo de quimioluminiscencia ECL Plus Western blotting Detection System® (GE Healthcare). Posterior al blanqueo de las membranas con solución de stripping (50 mM, Tris pH 6.8, 100 mM β -mercaptoethanol, and 2% SDS) por 30 minutos a 50°C, las membranas se incubaron con el anticuerpo específico contra las formas totales de las proteínas como control de carga.

6.3. Dinámica de Ca²⁺ intracelular

Los cultivos con una confluencia entre el 70 y 85% fueron incubados con 5 μ M de Fluo-4 AM en solución Krebs con BSA al 0.05% por 20 minutos. Posteriormente, los cultivos se lavaron durante 7 min con solución de Krebs y se colocaron en una cámara de registro con flujo constante, acoplada a un microscopio de fluorescencia invertido. Las imágenes de fluorescencia fueron visualizadas con un objetivo 20X y registradas utilizando una cámara *Evolution QEi* (Media cybernetics) con una frecuencia de 3 Hz. Las secuencias de imágenes fueron evaluadas con el programa *ImageJ* (NIH-USA).

6.4. Ensayos de proliferación celular

La proliferación celular fue evaluada a través de un método indirecto utilizando el método MTT que se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), 3X10³ células fueron colocadas en cajas de cultivo de 96 pozos en medio DMEM con 0.02% de suero bovino fetal. Posteriormente las células fueron tratadas con el agonista BzATP y después de 48 horas en incubación se agregó a cada pozo 20 μ L del reactivo MTT en medio Optimem (Gibco). Las preparaciones fueron incubadas por 4 horas en este medio y terminado el tiempo de incubación la densidad óptica fue leída a $\lambda=490$ nm.

6.5 Análisis estadístico

En el caso de la dinámica de Ca^{2+} intracelular los registros obtenidos se analizaron en una hoja de cálculo para obtener el valor máximo de fluorescencia en cada uno de los tratamientos aplicados, este valor se normalizó al valor de fluorescencia basal y se graficó el promedio del total de células registradas. Se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey para comparar entre los tratamientos.

Para los análisis de proteínas fosforiladas por Western blot se cuantificó la densitometría de las bandas obtenidas en cada experimento y se normalizó al valor del basal en cada experimento. Posteriormente los valores de la densitometría se analizaron por la prueba estadística adecuada. Para la fosforilación de ERK y AKT dependiente del tiempo se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía seguida de una prueba de Dunnett para comparar entre los tiempos de tratamiento evaluados. En el caso del análisis de fosforilación de ERK en presencia del agonista y antagonista del receptor, se realizó la prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey para comparar entre los grupos de tratamiento. Para el análisis de la dependencia de calcio en la fosforilación de ERK, la inhibición del receptor de EGFR con AG1478 y los análisis de proliferación celular, se realizó la prueba ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Bonferroni para comparar entre grupos de tratamiento.

7. Resultados

7.1. Registros de concentración de Ca^{2+} intracelular

Con el fin de documentar la funcionalidad del receptor P2X7 en células SKOV-3 realizamos estudios de movilización de calcio intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por microscopía de fluorescencia, utilizando el agonista selectivo BzATP y el antagonista específico A438079 (Bradley et al., 2011; Donnelly-Roberts et al., 2009).

En primer término se observó que la estimulación de las células SKOV-3 con $10\mu\text{M}$ BzATP cuya concentración actúa selectivamente sobre los receptores P2X7 (North & Surprenant, 2000; Donnelly-Roberts et al., 2009), indujo un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Con el fin de corroborar si este aumento de calcio es mediado específicamente por receptores P2X7 utilizamos el antagonista selectivo A438079 a una concentración de $10\mu\text{M}$, aplicando el siguiente protocolo: las células fueron perfundidas por 30 s en solución de Krebs normal (KN), seguido de 2 min de perfusión con el antagonista específico A438079 ($10\mu\text{M}$), después de este tiempo de preincubación se co-aplicó el agonista BzATP $10\mu\text{M}$ por 30 s, las células fueron entonces lavadas con solución KN por 10 min. Después del lavado fue nuevamente aplicado solo el agonista $10\mu\text{M}$ BzATP.

Como es mostrado en la figura 7, los resultados indican que la respuesta en presencia del antagonista fue inhibida, y el efecto del agonista fue observado después del lavado de la droga ($n=100$). Este resultado sugirió que el receptor que responde a BzATP es el P2X7 dado que la actividad se promovió en una baja concentración del agonista y se inhibió en presencia del antagonista selectivo.

El mismo protocolo de estimulación fue realizado utilizando ATP $10\mu\text{M}$ como agonista, una concentración que no activa al receptor P2X7 y que es mediada principalmente por receptores P2Y, (Donnelly-Roberts, 2009). En estos experimentos, como se ilustra en la figura 7 fue observado que el A438079 no inhibió el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, este efecto parece indicar que a pesar de que otros receptores purinérgicos pueden promover un incremento de Ca^{2+} en

respuesta al ATP, el efecto observado por estimulación con BzATP depende únicamente de la activación del receptor P2X7. También es relevante que la cinética de incremento de $[Ca^{2+}]_i$ que se obtuvo en estos experimentos en las células SKOV-3 estimuladas ya sea con BzATP o con ATP es similar a la observada en los experimentos realizados previamente en nuestro laboratorio.

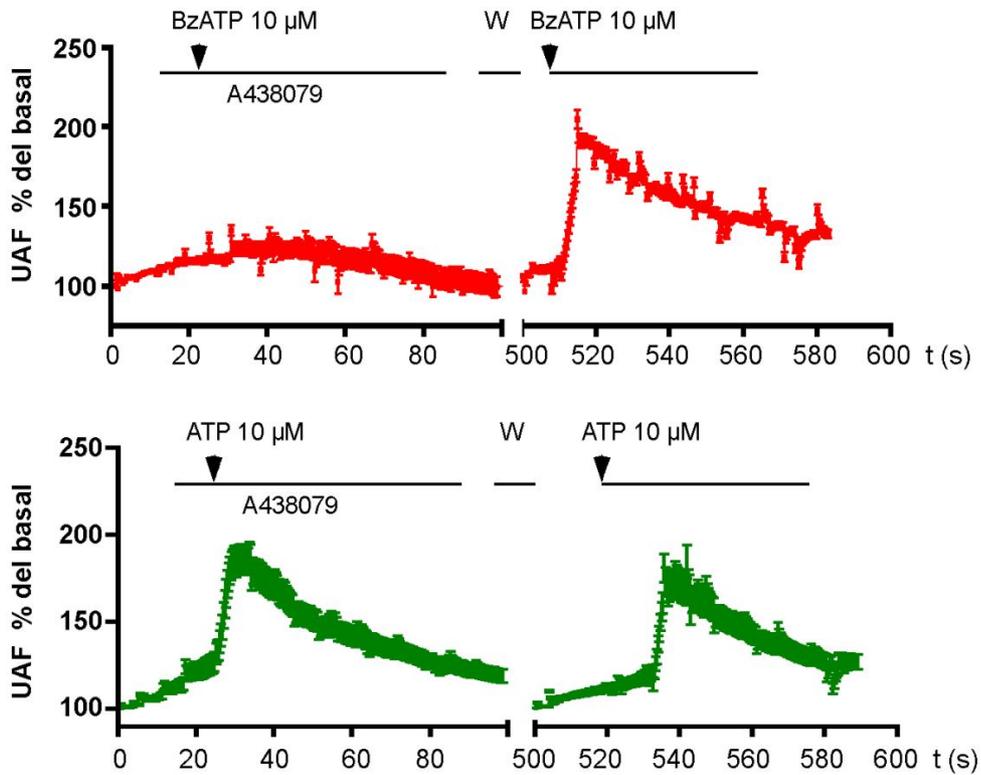


Figura 7.- **Trazo representativo de las respuestas de incremento de Ca^{2+} intracelular en células SKOV-3.** Las células fueron estimuladas con los agonistas del receptor P2X7 (BzATP, ATP) y el antagonista A438079 (10 μ M). W indica el período de lavado (wash), las flechas indican el momento de aplicación de los fármacos, se cuantificaron unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) como porcentaje del valor basal, contra el tiempo (t) en segundos.

En la figura 8 se resumen los resultados de respuestas de incremento de calcio intracelular a los agonistas BzATP y ATP en presencia o ausencia del antagonista A438079. En ésta gráfica se observa que el antagonista A438079 es eficiente para inhibir la respuesta obtenida cuando se aplica BzATP, pero no es efectivo para inhibir la respuesta al aplicar ATP como

agonista. Se encontró una diferencia significativa al comparar el tratamiento de BzATP y A438079 con los demás grupos.

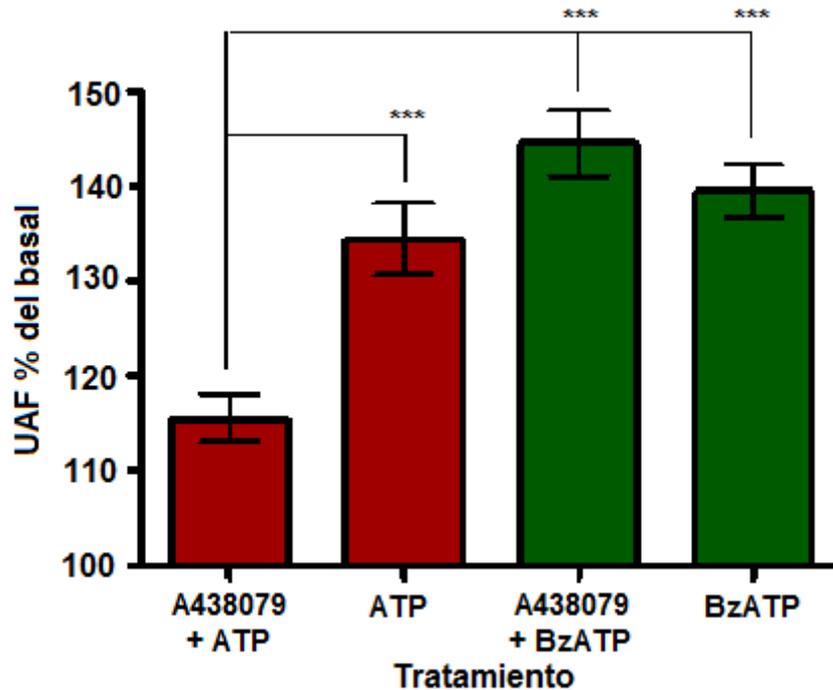


Figura 8.- Efecto del tratamiento de células SKOV-3 con BzATP, ATP y A438079 en el incremento de Ca^{2+} intracelular. Se grafican los cambios en valores de fluorescencia máximos (en unidades arbitrarias de fluorescencia, UAF) con respecto al valor de fluorescencia basal (% del basal) obtenidos por la aplicación de cada tratamiento, A43 indica la aplicación del antagonista A438079, ANOVA *** $p < 0.001$ vs A43+BzATP.

7.2. Efecto de la estimulación del receptor P2X7 sobre la activación de las cinasas ERK y AKT

Con el objetivo de investigar si la fosforilación de ERK inducida por BzATP depende directamente del receptor P2X7 utilizamos al antagonista A438079, para esto, células SKOV-3 fueron pre-incubadas por 15 min con 10 μ M del antagonista, y posteriormente fueron tratadas con BzATP (10 μ M) por 15 min adicionales en presencia del antagonista. Los resultados ilustrados en la figura 9 muestran que la fosforilación de las ERKs inducida por BzATP en las células

SKOV-3 fue inhibida por A438079. Este resultado corrobora que los efectos de BzATP sobre la fosforilación de ERKs son mediados por el receptor P2X7.

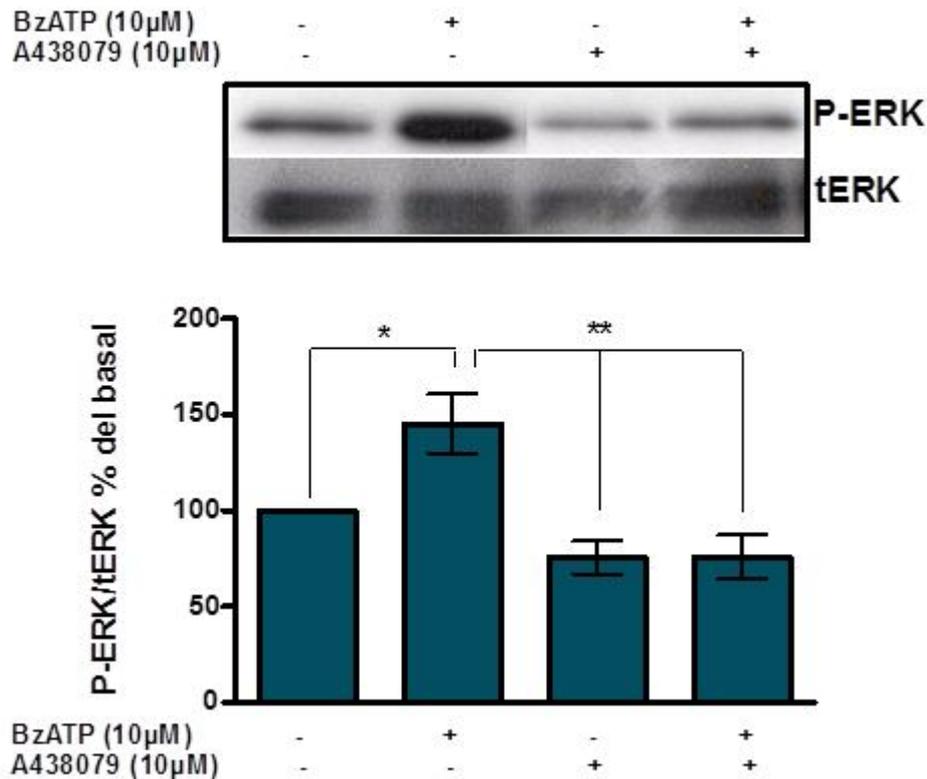


Figura 9.- **Efecto del antagonista A438079 en la fosforilación de ERKs en células SKOV-3.** El aumento en la fosforilación de las proteínas ERK por estimulación del receptor P2X7 con BzATP es inhibida por la preincubación con el antagonista A438079. En el panel superior se muestran las imágenes representativas de las bandas obtenidas por Western blot y en el panel inferior se muestra la gráfica con la cuantificación de la densitometría de tres experimentos independientes. P-ERK se refiere a las proteínas ERK fosforiladas, mientras que tERK a las proteínas ERK totales, ANOVA * $p < 0.05$ basal vs BzATP, ** $p < 0.01$ BzATP vs BzATP+A438079 y BzATP vs 438079.

Con el fin de estudiar si el aumento en los niveles de fosforilación de ERK inducido por BzATP es dependiente de la concentración se incubaron células SKOV-3 con diferentes concentraciones de BzATP por 5 minutos y analizamos los niveles de fosforilación de ERK, los valores obtenidos se ajustaron a una curva sigmoïdal con una EC_{50} de 33.5 ± 0.34 nM (Figura 10).

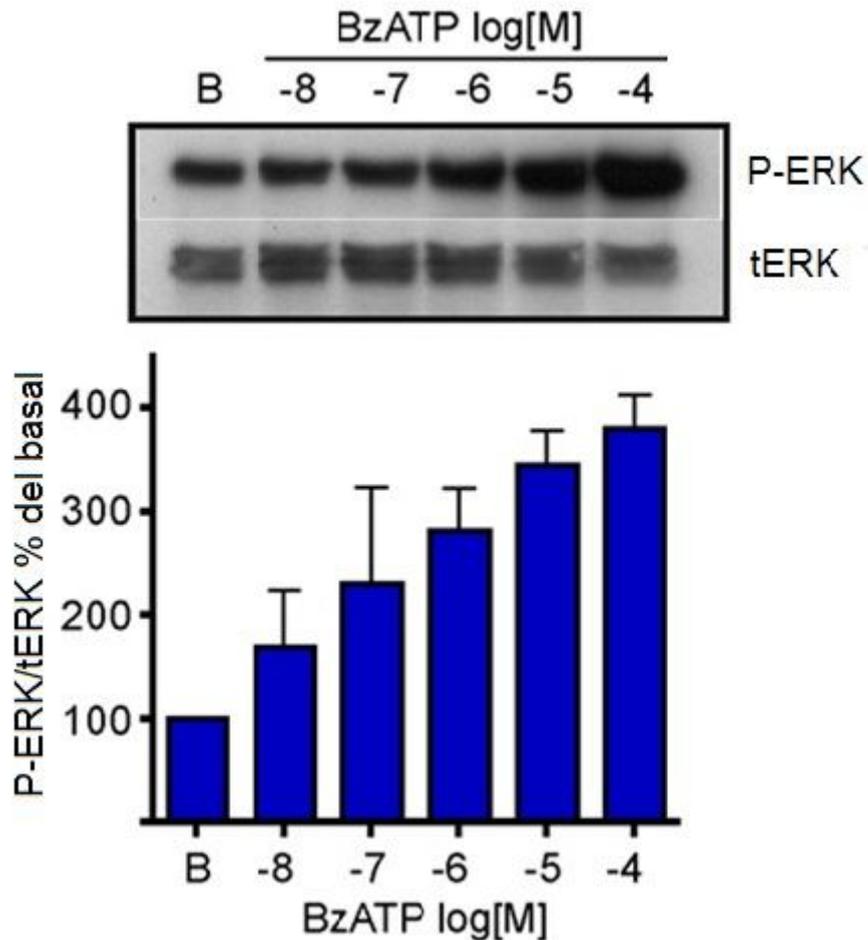


Figura 10.- **Efecto de la concentración de BzATP en la fosforilación de ERKs en células SKOV-3.** Las células estimuladas con BzATP promueven la fosforilación de las cinasas ERK, en una forma dependiente de la concentración. En el panel superior se muestran las imágenes representativas de las bandas obtenidas por Western blot y en el panel inferior se muestra la gráfica con la cuantificación de la densitometría de tres experimentos independientes. P-ERK se refiere a las proteínas ERK fosforiladas, mientras que tERK a las proteínas ERK totales,

Posteriormente analizamos la fosforilación de las ERKs en cultivos estimulados con BzATP (10 μ M) en función del tiempo. El resultado obtenido (Figura 11) mostró que BzATP a dicha concentración indujo la activación de las ERKs desde los primeros 5 min de estimulación, y el aumento se mantuvo a lo largo del tiempo estudiado (120 min).

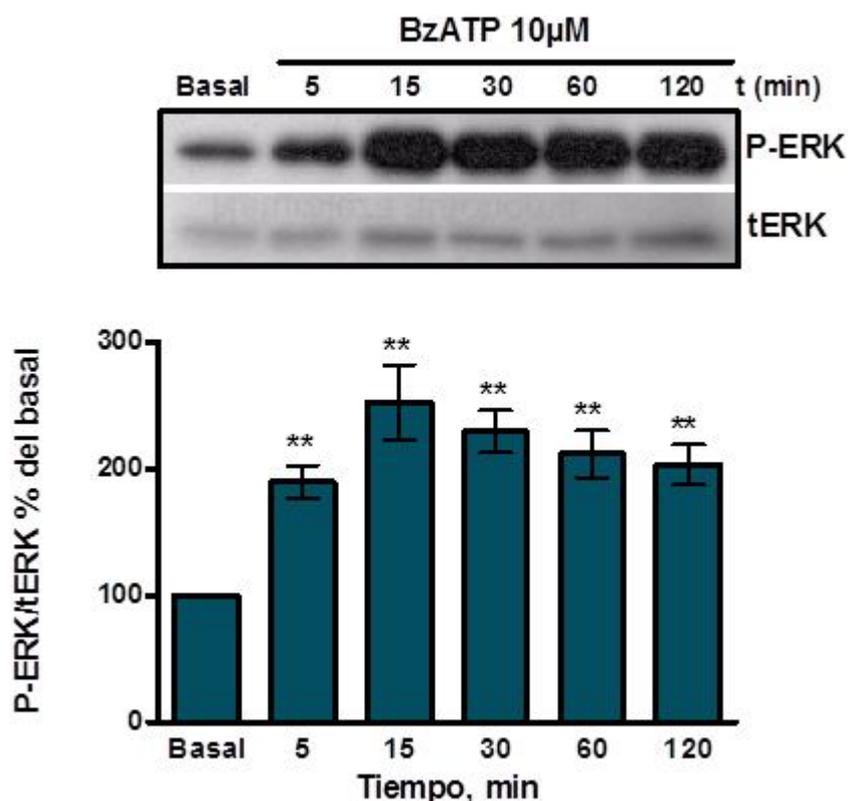


Figura 11.- **Efecto del tiempo de estimulación del receptor P2X7 en la fosforilación de ERKs en células SKOV-3.** Las células fueron incubadas con el agonista BzATP a diferentes tiempos y se observó el efecto en la fosforilación de las proteínas ERK. En el panel superior se muestran las imágenes representativas de las bandas obtenidas por Western blot y en el panel inferior se muestra la gráfica con la cuantificación de la densitometría de tres experimentos independientes. P-ERK se refiere a las proteínas ERK fosforiladas, mientras que tERK a las proteínas ERK totales ANOVA ** $p < 0.01$ vs Basal.

Para evaluar el posible efecto del receptor P2X7 en la activación de la vía PI3K/AKT, la fosforilación de AKT en células SKOV-3 incubadas con BzATP a diferentes tiempos fue evaluada por Western blot. Como puede ser observado en la figura 12, BzATP (10 μ M) indujo la fosforilación de AKT desde los 5 min, el aumento fue hasta de 40% con respecto a la actividad basal, alcanzó su máximo a los 5 min y se mantuvieron a lo largo del tiempo hasta los 120 minutos.

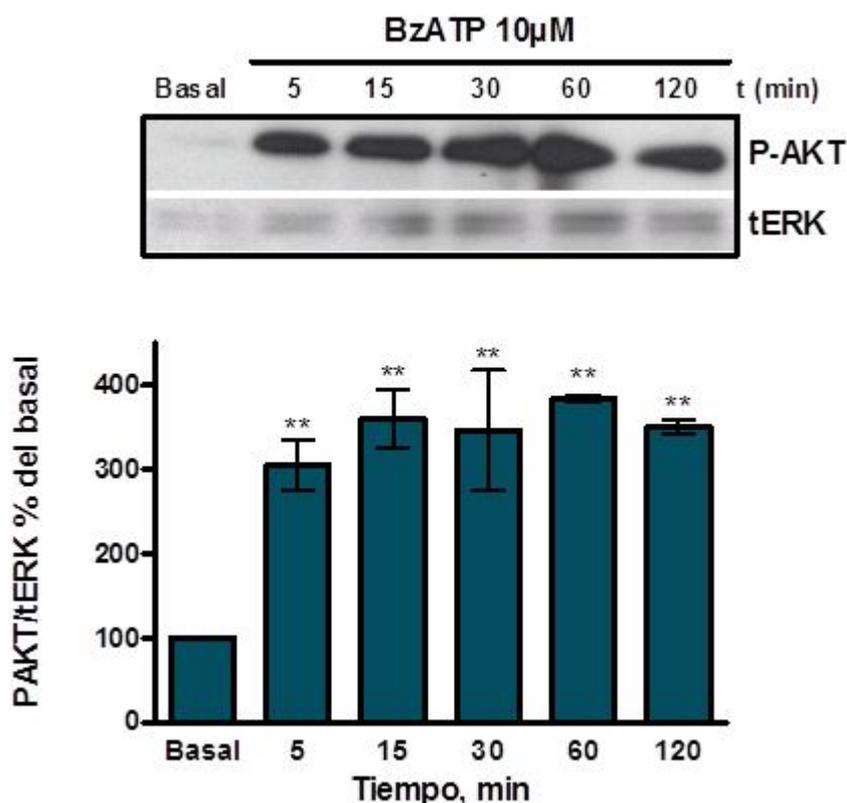


Figura 12.- **Efecto de la estimulación con BzATP en la fosforilación de AKT en células SKOV-3**, Las células fueron incubadas con el agonista BzATP a diferentes tiempos y se observó el efecto en la fosforilación de la cinasa AKT. En el panel superior se muestran las imágenes representativas de las bandas obtenidas por Western blot y en el panel inferior se muestra la gráfica con la cuantificación de la densitometría de tres experimentos independientes. P-AKT se refiere a las proteínas ERK fosforiladas, mientras que tERK a las proteínas ERK totales. ANOVA **p<0.01 vs basal.

7.3. Mecanismos intracelulares involucrados en la fosforilación de ERK por la activación de P2X7

Para evaluar la participación de Ca^{2+} en la activación de las ERKs, cultivos de células SKOV-3 fueron tratadas con BAPTA-AM, un agente quelante de calcio que permea la membrana celular, 20 minutos antes de estimular con el agonista BzATP. La fosforilación de ERK se evaluó en los intervalos de tiempo estudiados anteriormente (5, 15, 30, 60 y 120 min).

En estas condiciones el tratamiento con BAPTA no inhibe el aumento en la fosforilación de ERK inducida por BzATP, sino que al contrario a los 60 y 120 minutos potencia dicho efecto (Figura 13). Además cuando se incubaron las células únicamente con BAPTA el nivel basal de fosforilación de ERK no se modificó lo que sugiere que el aumento en la fosforilación de ERK por BzATP no es dependiente de la movilización de calcio intracelular y el efecto potenciador debe ser analizado en estudios futuros.

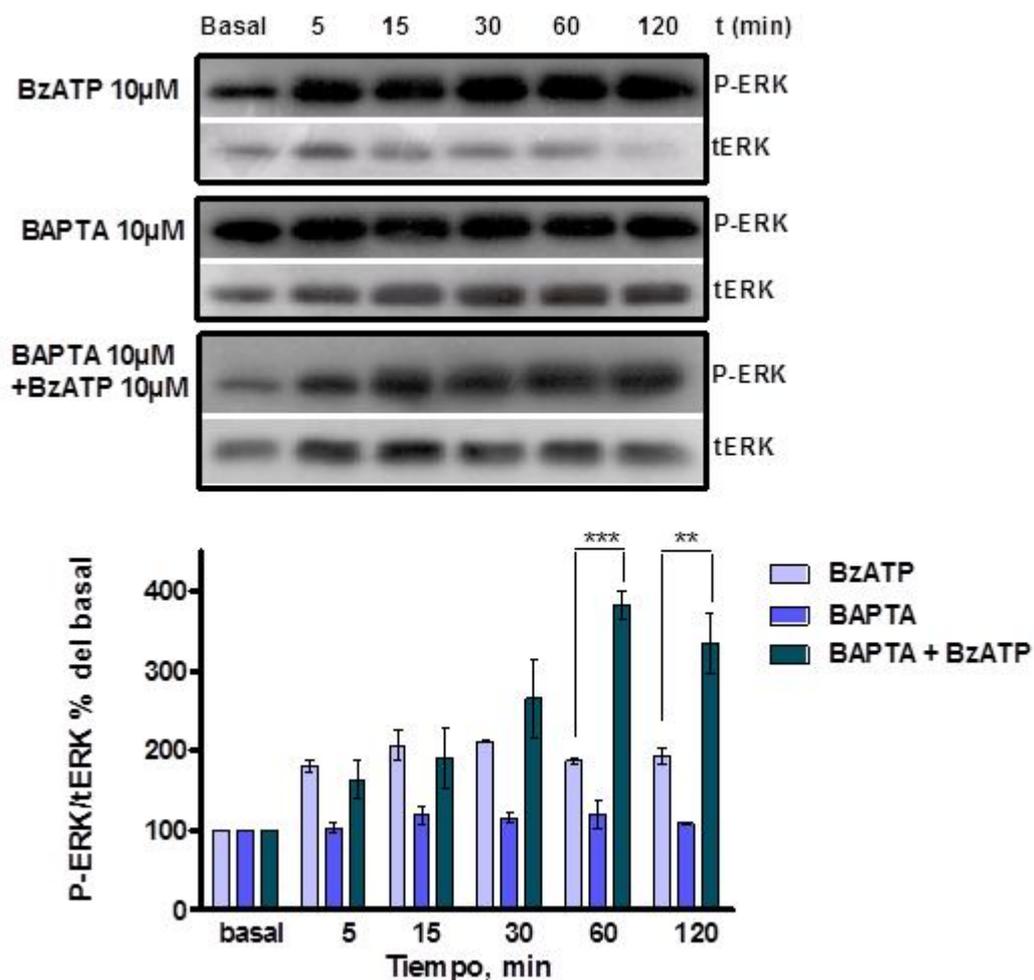


Figura 13.- Efecto del agente quelante de calcio BAPTA-AM sobre la fosforilación de ERKs dependiente del receptor P2X7 en células SKOV-3. En el panel superior se muestran las imágenes representativas de las bandas obtenidas por Western blot y en el panel inferior se muestra la gráfica con la cuantificación de la densitometría de tres experimentos independientes. P-ERK se refiere a las proteínas ERK fosforiladas, mientras que tERK a las proteínas ERK totales. ANOVA

***p<0.001 BzATP vs BAPTA+BzATP, **p<0.01 BzATP vs BAPTA+BzATP.

Para corroborar que el agente quelante BAPTA-AM inhibe la movilización de calcio intracelular, se realizaron registros de la movilización de calcio inducido por ATP 10 μ M en células previamente incubadas con una concentración de BAPTA-AM 10 μ M en DMSO 0.1% o bien con DMSO solo (0.1%), en intervalos de tiempo idénticos a los utilizados previamente (5, 15, 30, 60 y 120 minutos) usando como agonista al ATP en una concentración 10 μ M. El resultado se muestra en la figura 14, y se observa que el agente quelante es eficiente en capturar el calcio intracelular en todos los tiempos estudiados, en cambio el DMSO no tuvo efecto.

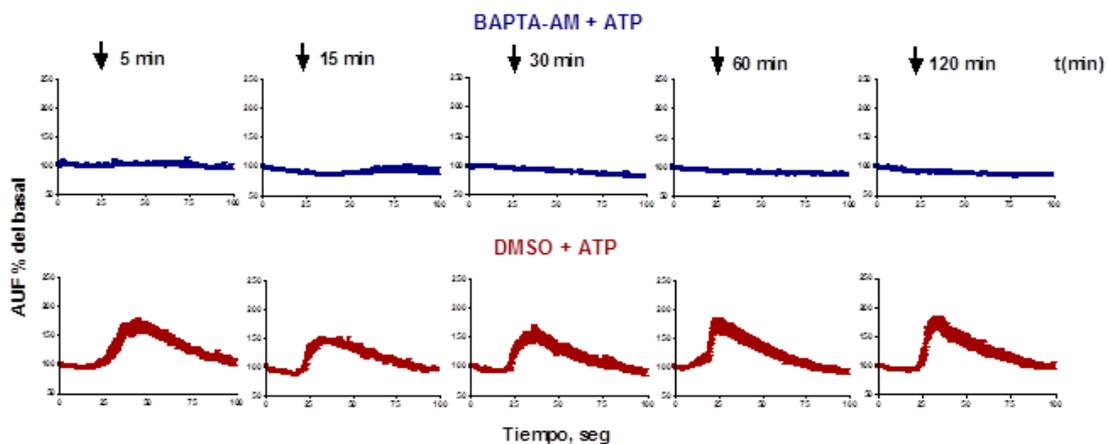


Figura 14.- Efecto del agente quelante BAPTA-AM en la movilización de calcio intracelular en células SKOV-3. El BAPTA-AM inhibió la movilización de Ca²⁺ intracelular en los tiempos de incubación estudiados en células estimuladas con ATP 10 μ M (Páneles superiores), mientras que el vehículo (DMSO) no presentó dicho efecto (Páneles inferiores). Las flechas indican el momento de la aplicación de ATP.

Estos resultados indican que existe al menos otro mecanismo por el que P2X7 induce la activación de ERK, por ejemplo esta actividad puede depender de interacciones proteicas mediadas por sitios de interacción (por ejemplo SH3-GRB2) presentes en el extremo carboxilo terminal del receptor P2X7 que regulen directamente la actividad de alguna proteína cinasa. También es

posible que tenga lugar la transactivación de receptores de EGF (EGFR) por parte del receptor P2X7 como ya se ha reportado en células HEK293 (Stefano et al., 2007). Para evaluar si el receptor P2X7 puede tener un efecto en la transactivación de la vía del factor de crecimiento EGF, células SKOV-3 fueron pre-incubadas con el inhibidor de la actividad de cinasa del receptor EGFR el AG1478, estimulando por diferentes tiempos con BzATP (5, 15, 30, 60 y 120 min).

Los resultados de dicho experimento se muestran en la figura 15. A partir de los 30 min del tratamiento con BzATP 10 μ M, se inhibió la fosforilación de las cinasas ERK por la pre-incubación con el inhibidor AG1478 (10 μ M). En la figura 15 se muestra gráficamente la comparación de los valores de densitometría de las bandas obtenidas para las células tratadas con BzATP en presencia o ausencia de AG1478. Diferencias significativas se encontraron entre ambos tratamientos para los tiempos de 5 a 120 minutos, resultando evidente el efecto del inhibidor en la fosforilación de ERK desde tiempos muy cortos, este efecto inhibitorio incluso está por debajo del valor basal observado de los 30 a 60 minutos. Cuando el inhibidor fue aplicado solo, disminuyó la fosforilación de ERK por debajo del valor basal, lo que podría indicar un papel del EGF en el mantenimiento del tono de fosforilación de ERK.

Este resultado nos sugirió que posiblemente la transactivación del receptor de EGF podría explicar el mantenimiento del efecto en la fosforilación de ERK en tiempos más prolongados (de 30 a 120 minutos), dado que la inhibición de la actividad de cinasa con AG1478 bloquea este efecto, sin embargo hay un período (alrededor de los 5 min) en el que el inhibidor no logró evitar la fosforilación de ERK, será necesario entonces profundizar en mecanismos que regulan en tiempos cortos la fosforilación de ERK por el BzATP.

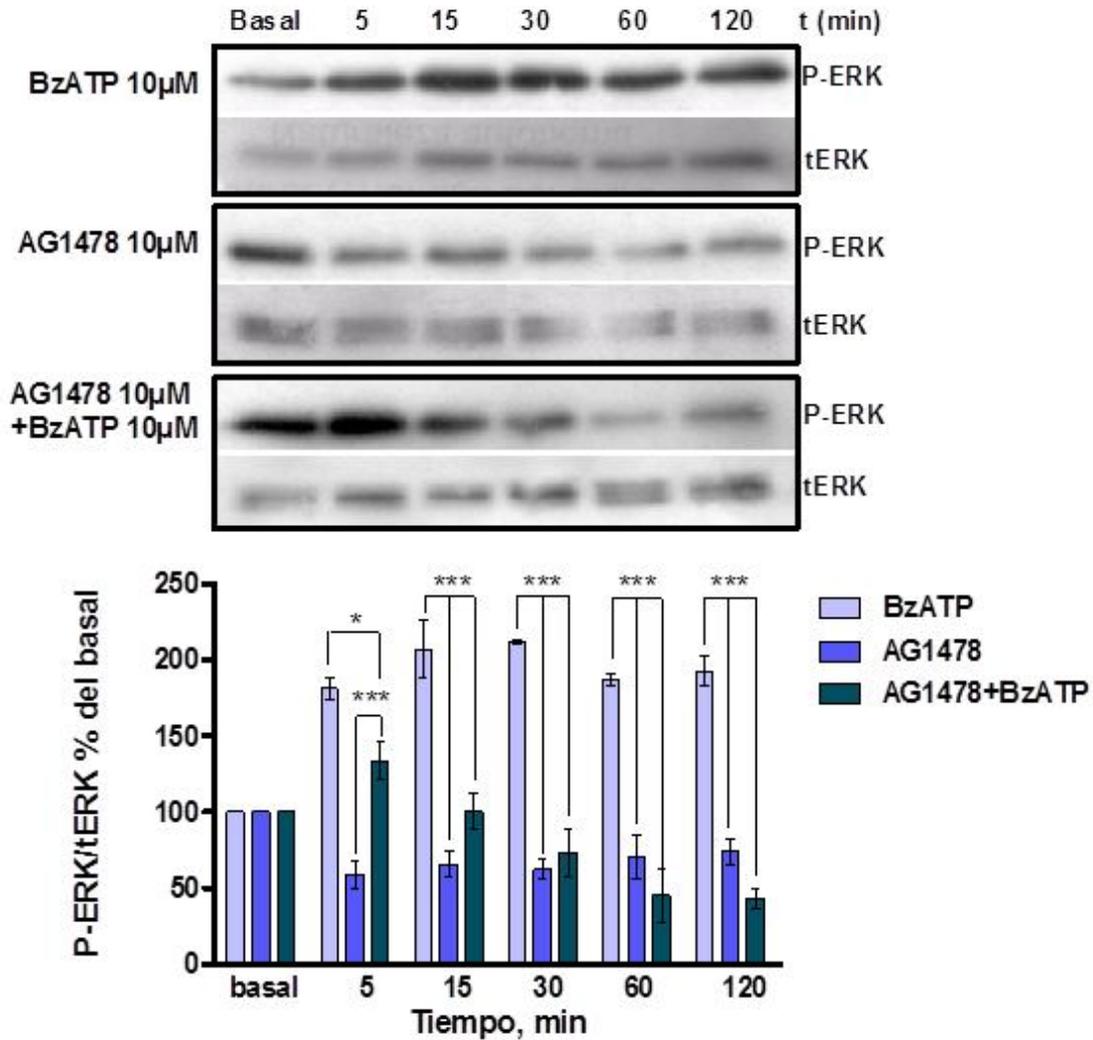


Figura 15.- Efecto del inhibidor de la actividad de cinasa de tirosina del EGFR **AG1478** en la fosforilación de las proteínas ERK en células SKOV-3. En el panel superior se muestran las imágenes representativas de las bandas obtenidas por Western blot y en el panel inferior se muestra la gráfica con la cuantificación de la densitometría de tres experimentos independientes. P-ERK se refiere a las proteínas ERK fosforiladas, mientras que tERK a las proteínas ERK totales. ANOVA ***p<0.001 BzATP vs AG1478, BzATP vs AG1478+BzATP, y AG1478 vs AG1478+BzATP, *p<0.05 BzATP vs AG1478+BzATP.

7.4. Efecto en la proliferación celular

El efecto en la fosforilación de ERK y AKT sugieren que el efecto de BzATP a través de la activación del receptor P2X7 podría tener efectos proliferativos sobre las células SKOV-3. Por lo que se evaluó dicho efecto por el método de reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) que permite cuantificar la actividad mitocondrial y que en algunos casos refleja mayor número de células vivas, aunque es necesario confirmar estos resultados con un método que nos permita realizar el conteo de células en proliferación, por ejemplo incorporación de nucleótidos marcados radiactivamente. En la figura 16 se muestran los resultados de la absorbancia cuantificada a una $\lambda=490\text{nm}$ del producto colorido generado por la actividad mitocondrial, y registrada después de estimular las células SKOV-3 por 48 horas con $10\mu\text{M}$ de BzATP solo o en presencia del antagonista del receptor P2X7, A438079.

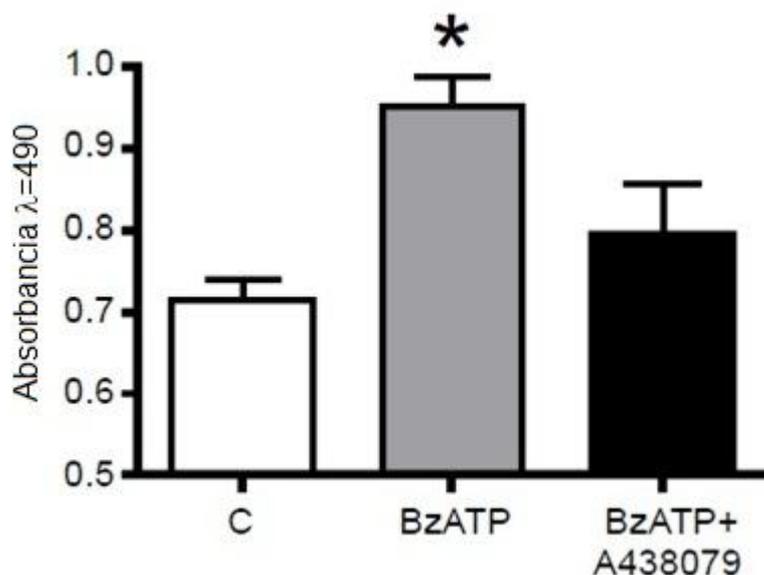


Figura 16.- Efecto en la proliferación celular por estimulación del receptor P2X7 con BzATP en células SKOV-3. Donde c se refiere al control que corresponde a células no incubadas con los fármacos. ANOVA * $P<0.05$ BzATP vs c

En la figura 16 se observa que la estimulación de las células con BzATP indujo el incremento en la proliferación celular de $32\pm 5\%$ con respecto al valor basal, arrojando una diferencia estadísticamente significativa, este efecto en la proliferación celular fue inhibido por el antagonista hasta un $11 \pm 3\%$ sobre el basal.

8. Discusión

El presente trabajo de tesis demuestra que el receptor P2X7 está implicado en la proliferación de las células de adenocarcinoma ovárico SKOV-3 mediante la activación de vías mitogénicas como ERK y AKT, además los resultados sugieren que el mecanismo por el que activa la vía de ERK es independiente de la movilización de calcio intracelular y es dependiente de la transactivación del EGFR. El receptor P2X7 se encuentra presente en varios tipos celulares, como son células epiteliales, hematopoyéticas, microglia, astrocitos, entre otros (López-Castrejón et al., 2006), y se ha estudiado ampliamente que se encuentra en todas las células del sistema inmune donde tiene implicaciones importantes en su función (Faria et al., 2009; Faria et al., 2010). Asimismo el receptor P2X7 se ha relacionado con varios procesos patológicos entre estos artritis, dolor inflamatorio y neuropático, neurodegeneración y neuroinflamación y cánceres epiteliales (Bradley et al., 2011).

Nuestro grupo de trabajo ha sido pionero en el estudio de estos receptores en las células somáticas del ovario, específicamente en células de la teca. Al respecto, hemos descrito que la actividad de los receptores P2X7 induce la muerte celular activando el apoptosoma dependiente de la mitocondria, como consecuencia de la sobrecarga de Ca^{2+} citosólico, y se ha propuesto que los receptores P2X7 pueden facilitar en el proceso ovulatorio (Vázquez-Cuevas et al., 2006). De hecho, en estos mismos trabajos se identificó la expresión de P2X7 en células del OSE y dado que este epitelio es clave en los mecanismos que dan como resultado la expulsión del ovocito en la ovulación, hemos continuado con su estudio.

Otra de las implicaciones importantes de la expresión del receptor P2X7 en el OSE es que en esta estructura se origina el 90% de los cánceres ováricos. Dado que el P2X7 ha sido descrito como un mediador de muerte celular, y los mecanismos de evasión de la apoptosis son claves en la carcinogénesis, P2X7 ha sido estudiado en diferentes modelos de cáncer. Así, en varios trabajos se ha mostrado que la expresión del receptor se incrementa en células tumorales, y en algunos se ha tratado de evaluar la funcionalidad del mismo en líneas de

tumores primarios (Di Virgilio et al., 2009). Se ha encontrado la expresión del receptor en leucemia linfocítica aguda donde una mutación puntual en el extremo C-terminal de P2X7 (E496A) impide la formación del megaporo y por ende el receptor activo no es capaz de inducir apoptosis de los linfocitos B (Costa-Junior et al., 2011). En células de neuroblastoma se ha descrito que aunque el receptor es completamente funcional y puede formar el poro, se pierde el efecto citotóxico del ATP, pero el mecanismo no se conoce (Di Virgilio et al., 2009). En procesos de cáncer epitelial se ha encontrado que el receptor P2X7 puede ser utilizado como un biomarcador de progresión tumoral en células epiteliales uterinas (Li et al., 2006). En éste mismo tipo celular, se encontró posteriormente, que la expresión del receptor está a la baja en células cancerosas y se sugirió que las células de cáncer desarrollan un mecanismo para disminuir su expresión y así evadir la apoptosis (Li et al., 2008). En el contexto del adenocarcinoma ovárico no se ha estudiado el papel del receptor P2X7.

Además de ser un mediador de muerte celular el sistema purinérgico puede favorecer la proliferación tumoral. El receptor P2X7 es un canal catiónico, el papel que tiene en la actividad de las células que lo expresan es relevante para la homeostasis iónica celular. Por ejemplo, el Ca^{2+} que entra a la célula, posterior a la estimulación del receptor, puede tener un papel importante en la actividad bioquímica mitocondrial, dado que es necesario para la actividad de varias enzimas de la vía oxidativa y en la síntesis de NADH que a su vez es requerido para la síntesis de ATP mitocondrial. Se ha observado que las células que expresan al receptor P2X7, ya sea de forma nativa o por transfección, tienen fosforilación oxidativa eficiente y un alto contenido de ATP. Bajo esta hipótesis, las células que expresan al receptor, tendrían una liberación tónica de ATP debida a la eficiente producción de ATP en las mitocondrias como resultado del incremento de Ca^{2+} intracelular y al interior de la mitocondria, la estimulación tónica induciría el crecimiento y la diferenciación celular hasta que la concentración de ATP sea tan elevada que se vuelva citotóxica (Di Virgilio et al., 2009).

En apoyo a estas posibilidades, el mismo grupo encontró que la concentración de ATP en el espacio intersticial tumoral llega hasta un rango de setecientos

micromolar en tumores de células OVCAR-3 de carcinoma ovárico humano inducidos en ratones desnudos, mientras que el ATP tenía valores indetectables en células sanas (considerando que el límite de detección del método del estudio fue de 1-5 μM) (Pellegatti et al., 2008). La idea de que el ambiente tumoral proporciona a las células un aporte de glucosa y ATP adecuado para la proliferación y diseminación tumoral ya había sido propuesta anteriormente en múltiples estudios (Warburg, 1956; Schulz et al., 2006; Kim & Dang, 2006). Las células neoplásicas ya sea por respiración o por glucólisis tienen un aporte continuo y eficiente de ATP que permite su crecimiento y según la hipótesis planteada por Di Virgilio y colaboradores (2009), las células que expresan al receptor P2X7 mantendrán una tasa metabólica alta debido a la estimulación tónica de ATP y al consecuente influjo de Ca^{2+} . La idea de que el sistema purinérgico opera de acuerdo a esta lógica fundamenta una atractiva hipótesis de trabajo, que supone que las células tumorales presentan una liberación tónica de ATP suficiente para activar al receptor P2X7, y que su activación mantendrá una tasa metabólica elevada y promoverá la proliferación de estas células y el crecimiento del tumor.

Estudios de nuestro laboratorio han sido dirigidos a entender el posible papel de P2X7 en la fisiología y patología del OSE. Con este fin se caracterizó la expresión del receptor P2X7 por métodos de inmunohistoquímica en biopsias de adenocarcinoma ovárico y en muestras sin transformación neoplásica aparente. En estos estudios, se encontró que la expresión del receptor que se observa de manera específica en el OSE de los ovarios sanos se incrementa marcadamente en las estructuras de origen epitelial que presentan hiperplasia e hipertrofia. Observaciones similares han sido realizadas en tumores de próstata, mama, piel, neuroblastoma, leucemia y carcinoma papilar de tiroides donde el receptor es apenas detectable en tejido sano, pero se expresa intensamente en el tejido tumoral (Adinolfi et al., 2002; Greigh et al., 2003; Slater et al., 2004a; Slater et al., 2004 b; Solini et al., 2008; Di Virgilio et al., 2009). Sin embargo, estas observaciones contrastan con los observado por Li y colaboradores en el carcinoma del endometrio uterino, donde la expresión del receptor en tejido transformado se encuentra reducida (Li et al., 2006).

Para profundizar en estas observaciones se utilizó la línea celular de adenocarcinoma ovárico humanas SKOV-3. Estudios de nuestro laboratorio han evidenciado la expresión del receptor P2X7 por métodos de RT-PCR, Western blot e inmunofluorescencia en estas células (Vázquez-Cuevas et al., Enviado). En estudios previos analizando la cinética de movilización de Ca^{2+} inducida por la estimulación selectiva del receptor P2X7 se encontró que las respuestas de Ca^{2+} presentan una cinética diferente a la observada en cultivos primarios de células del OSE de ratón (Lara-Mejía 2012). El análisis de estos datos nos llevó a suponer que en SKOV-3 no se activó el megaporo, probablemente debido a que en estas células la actividad de P2X7 no induce muerte celular.

En otros sistemas celulares tales como células acinares de parótida de rata, células de astrocitoma humano y células pancreáticas, la activación del receptor P2X7 induce la fosforilación de las cinasas ERK de manera dependiente (Bradford & Soltoff, 2002; Gendron et al., 2002) e independiente de Ca^{2+} (Amstrup & Novak, 2003).

Consistentemente con las evidencias que indican que el receptor P2X7 puede activar vías de señalización intracelular que median proliferación celular (Gendron et al., 2010; Bianco et al., 2004), en células SKOV-3 detectamos la fosforilación de la cinasa ERK por la activación de P2X7, una proteína cuya actividad está fuertemente relacionada con efectos mitogénicos. Todos estos antecedentes nos llevaron a la hipótesis de que la actividad del receptor P2X7 en células tumorales ováricas contribuye a la proliferación celular durante la progresión tumoral.

Los experimentos iniciales fueron dirigidos a corroborar la funcionalidad de P2X7 en las células SKOV-3, para tal fin utilizamos microscopía de fluorescencia funcional para estudiar el aumento de Ca^{2+} intracelular mediado por el receptor. Dado que el agonista selectivo BzATP (10 μM) induce un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} que es abolido si se preincuba a las células con el antagonista A438079, podemos afirmar que P2X7 es funcional en las células SKOV-3. Posteriormente analizamos la cascada de señalización que lleva a la fosforilación de ERK y su papel sobre la actividad proliferativa y también sobre la activación de AKT, una cinasa con

acciones de resistencia a la apoptosis. En el caso de ERK se encontró que la estimulación del receptor induce la activación de ERK con un máximo a los 15 minutos pero que se sostiene hasta 120 minutos, la activación de ERK es dependiente de la concentración de BzATP aplicada con una EC_{50} de 33.5 nM que es similar a la reportada para el receptor en células humanas por Donnelly-Roberts y colaboradores (2009), y además éste efecto se inhibió utilizando el antagonista del receptor A438079, resultado que fuertemente nos sugiere que la fosforilación de ERK observada se debe específicamente a la activación de P2X7. En reportes previos en células acinares de parótida de rata se observó que A438079 es efectivo en inhibir la fosforilación de ERK (Hedden et al., 2011).

La activación de ERK mediante su fosforilación en un modelo tumoral está íntimamente relacionada con la proliferación celular (Chambard et al., 2001). Uno de los aspectos fundamentales del presente trabajo fue investigar aspectos de la cascada de señalización que conduce a la fosforilación de ERK. El estudio de esta cascada puede revelar componentes intracelulares que representan potenciales blancos terapéuticos, pero además nos permite entender el mecanismo por el cual el receptor P2X7 puede señalizar hacia el interior de la célula, el hecho de que estos mecanismos puedan ser independientes de un aumento intracelular en la concentración de Ca^{2+} resulta novedoso.

La respuesta inmediata inducida por la activación del receptor P2X7 es un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} , por lo que los primeros experimentos en el estudio de esta cascada de señalización fueron dirigidos a estudiar el papel de este ión. Se sabe que la fosforilación de las ERK puede ser el resultado de la activación de isoformas de la PKC dependientes de un incremento de Ca^{2+} intracelular (Bradford & Soltof, 2002; Gendron et al., 2003).

Una serie de experimentos se centró en explorar si la vía de señalización de MAPK-ERK requiere de un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, se encontró que la preincubación de las células SKOV-3 con un quelante de Ca^{2+} no afectó la fosforilación de ERK inducida por la activación de P2X7. Este primer resultado nos sugiere que la activación de ERK puede ser mediada por

un mecanismo intracelular que involucra la acción directa del receptor sobre algún efector.

Una posible vía que puede mediar la fosforilación de ERK de forma independiente del aumento de Ca^{2+} intracelular es la activación de PKCs independientes de calcio, esa posibilidad necesita ser evaluada usando inhibidores específicos para los distintos tipos de PKC (independientes y dependientes de calcio). Los mecanismos que pueden activar PKC por receptores P2X7 independientemente de calcio incluyen a la fosfolipasa D (PLD), que puede producir diacilglicerol (DAG) que es requerido para la activación de PKCs (Bradford & Soltoff, 2002; Shemon et al., 2007).

Como se mencionó en la introducción, la estimulación del receptor P2X7 induce fosforilación de PKD por una vía que no depende de calcio en células acinares de parótida de rata (Bradford & Soltoff, 2002). En este mismo tipo celular se ha demostrado que la PKD/PKC μ puede mediar la fosforilación del receptor de EGF en dos residuos de treonina (T^{654} y T^{669}), por lo tanto, EGF está río abajo de PKD en algunos sistemas celulares y, por ende, que puede tener un papel importante en la señalización de los receptores P2X7 (Bagowski et al., 1999; Bradford & Soltoff 2002). También se ha reportado que la fosforilación de ERK puede llevarse a cabo por un mecanismo de transactivación del EGFR iniciado por la activación del receptor P2X7 en un modelo de expresión heterólogo, por lo tanto decidimos evaluar en las células SKOV-3 estimuladas con BzATP el papel de cinasas de tirosina como el receptor EGFR.

Para los receptores acoplados a proteínas G ya está descrita la forma en que se puede dar la transactivación del EGFR, en el caso de los receptores purinérgicos se ha estudiado dicha transactivación por el receptor P2Y2, este estudio se realizó en células de glándula salival humana y se demostró la participación de metaloproteasas para la activación de receptores a EGFR (Erb1 y Erb2) (Ratchford et al., 2010). Para evaluar este proceso se utilizó el inhibidor de la actividad de cinasa del receptor de EGF previo al tratamiento con BzATP. A partir de los 15 minutos de incubación se inhibió el efecto sobre la fosforilación de ERK, lo que sugiere que pudiera existir el proceso de transactivación del EGFR. Se ha observado que en células de cáncer ovárico

cultivadas en colágena, que permite el crecimiento celular en 3 dimensiones, se presenta una elevada expresión del EGFR y de metaloproteasas como la MMP-9, metaloproteasa que además está implicada en la pérdida de E-caderinas dependiente de EGFR en las células de OSE durante los procesos neoplásicos avanzados cuando las células se vuelven migratorias (Cowden et al., 2008).

Estudios de otros laboratorios han evidenciado la presencia de componentes que podrían estar involucrados en este proceso de transactivación, por ejemplo, la expresión abundante del complejo de agonista-metaloproteasa MMP tipo 1 (MT1-MMP, MMP14) anclado a la membrana de las células del OSE en tumores ováricos malignos (Adley et al., 2009), esta observación podría indicar la participación de este tipo de complejos en la activación de la vía del EGF. También resulta importante la participación de PKD/PKC μ y PLD. Posteriormente se evaluará cual es el mecanismo por el cual ocurre este proceso, si es por la participación de complejos de metaloproteasas o bien por cascadas de fosforilación intracelular que regulan al receptor de EGF.

La vía de señalización de EGF ha sido ampliamente estudiada en procesos de cáncer. En la fisiología de ovario contribuye a la proliferación postovulación y a la transición epitelio mesénquima de las células del OSE posterior a la ruptura ovulatoria, pero además hay evidencia de que se encuentra abundante expresión del receptor o de su ligando en cáncer ovárico, siendo muy relevante en estas condiciones patológicas por sus efectos mitogénicos. Por tales motivos, se ha dedicado gran esfuerzo en determinar el papel del EGF en células transformadas y en desarrollar fármacos que actúen como inhibidores de esta vía de señalización que puedan ser usados en la terapéutica clínica (Zeineldin et al., 2010). Específicamente, en células SKOV-3 se ha evaluado la fosforilación de ERK y la inducción de transición epitelio-mesénquima debida a la señalización por EGF y se encontró un patrón temporal de fosforilación de ERK similar al encontrado por estimulación del receptor P2X7. El efecto se observó desde los 5 minutos y se conservó por tiempos prolongados hasta 180 minutos en este caso (Cheng et al., 2010). De acuerdo a estos antecedentes, es posible que la vía de EGF participe en el efecto de activación de ERK que observamos en este trabajo, la descripción detallada de la forma en que se

pueda dar dicha transactivación es una de las perspectivas futuras del proyecto.

La cinasa de serina y treonina AKT es un regulador de apoptosis y del crecimiento celular, es activada por insulina, factores de crecimiento como EGF y por estrés celular, por lo que se ha investigado su papel en carcinogénesis (Mistafa et al., 2011). Esta cinasa presentó un patrón temporal de fosforilación similar al de las ERKs en respuesta a BzATP, esta fosforilación podría depender de una interacción directa entre el receptor P2X7 y la PI3K, sin embargo la vía de transducción que lleva a este efecto no ha sido detallada.

Este resultado tiene algunos antecedentes en otros modelos celulares, por ejemplo, ha sido reportado que el ATP puede activar la vía PI3K/ AKT en células MCF-7 que es una línea celular de cáncer de mama, este efecto fue asociado con los receptores P2Y2 o P2Y4 y con incremento en la proliferación celular (Scodelaro et al., 2010), en otras líneas celulares se ha encontrado fosforilación de AKT como resultado de la estimulación del receptor P2X7 con el agonista BzATP (Jaques-Silva et al., 2004; Mistafa et al., 2011)

Dicha observación puede ser relevante dado que la fosforilación de AKT es parte de una vía de evasión de la apoptosis que involucra a proteínas de la familia Bcl-2 que son relevantes en el proceso de progresión tumoral. Como es conocido, el correcto balance entre las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas producto de los genes de la familia Bcl-2 puede determinar el destino de las células transformadas (Frago et al., 2002), ya que cuando se rompe este equilibrio el destino puede ser hacia muerte o sobrevivencia. Este hecho abre otra vertiente importante que debe ser estudiada a futuro.

Los efectos celulares típicos de la activación de las vías de ERKs y AKT involucran la activación del ciclo celular, proliferación y evasión de la apoptosis. En el presente estudio, se observó que el tratamiento con BzATP estimuló la proliferación celular, efecto que se redujo utilizando el antagonista A438079, sugiriendo que el receptor P2X7 en célula SKOV-3 regula este proceso. Cabe sin embargo señalar, que el método empleado evalúa actividad metabólica celular y no proliferación por lo que estos hallazgos deberán ser corroborados

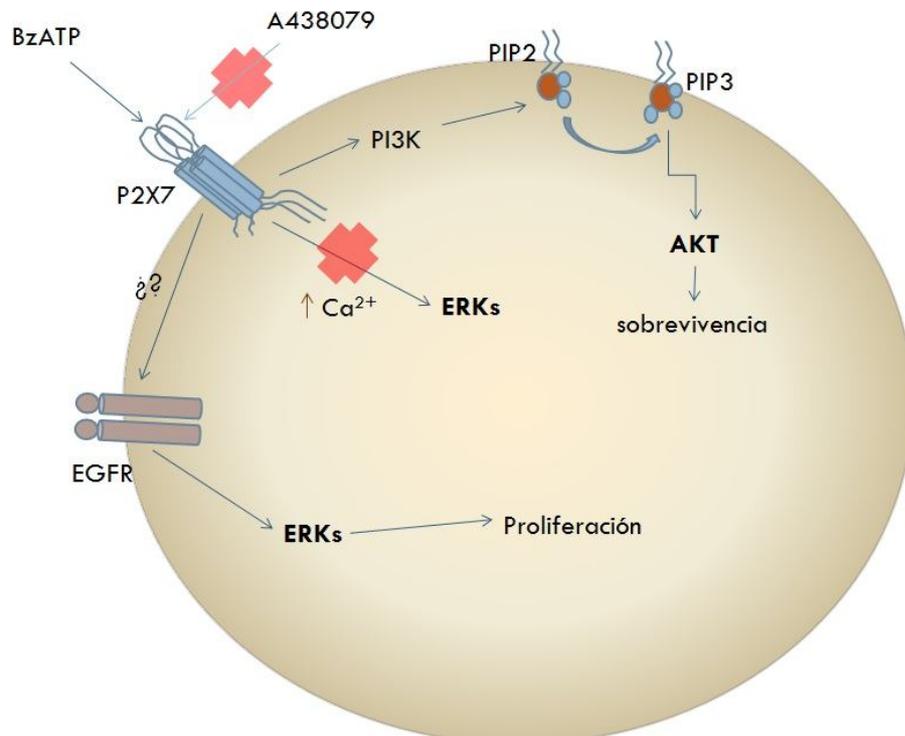
por métodos más específicos como el conteo del número de células y/o la síntesis de DNA.

El panorama general del problema que abordamos en el presente trabajo de tesis sugiere que el receptor P2X7 en el contexto de las células de cáncer de ovario no induce eficientemente la muerte celular por apoptosis como se ha mostrado en otros modelos celulares, en contraposición induce señales proliferativas y de sobrevivencia que pueden contribuir a la progresión tumoral. Si se correlacionan estos datos con la elevada actividad glicolítica que se ha observado en modelos tumorales (Warburg, 1956; Schulz et al., 2006; Kim y Dang, 2006), el sistema purinérgico puede ser un modulador clave del crecimiento tumoral. Por otra parte, los resultados del presente trabajo revelan que el receptor canal P2X7 puede señalar de manera independiente al aumento intracelular de calcio, lo que probablemente involucre interacciones directas con algunos efectores novedosos y abre la posibilidad de que P2X7 presente diversos mecanismos de transducción al interior de la célula.

9. Conclusiones

- El receptor P2X7 es funcional en términos de movilización de calcio, en las células SKOV-3 puede ser promovida selectivamente por BzATP y se inhibe por el antagonista A428079.
- El receptor P2X7 activó la vía de MAPK-ERK, a juzgar por la fosforilación de las cinasas ERK, en células SKOV-3.
- La fosforilación de ERK a través de P2X7 no fue dependiente del incremento de calcio intracelular.
- El mecanismo de fosforilación de la vía MAPK-ERK se inhibió por AG1478, un inhibidor de la actividad de cinasa de EGFR, sugiriendo que el mecanismo de activación de ERK en este tipo celular es dependiente de la transactivación del EGRF.
- La activación del receptor P2X7 activó la vía de PI3K/AKT, que se observó por la fosforilación de la cinasa AKT.
- La activación de la vía MAPK-ERK dependiente del receptor P2X7 indujo la probable proliferación de las células SKOV-3.

10. Esquema de la vía de señalización propuesta



11. Referencias

- Ackerman RC, Murdoch WJ. 1993. Prostaglandin-induced apoptosis of ovarian surface epithelial cells. *Prostaglandins*. 45:475–485
- Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J. Clin. Invest.* 119:1438-1449.
- Adinolfi E, Melchiorri L, Falzoni S, Chiozzi P, Morelli A, Tieghi A, Cuneo A, Castoldi G, Di Virgilio F, Baricordi OR. 2002. P2X7 receptor expression in evolutive and indolent forms of corionic B lymphocytic leukemia. *Blood*. 99:766-768.
- Adley BP, Gleason KJ, Yang XJ, Stack MS. 2009. Expression of membrane tipe 1 matrix metalloproteinase (MMP-14) in epithelial ovarian cancer: high level expression in clear cell carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 112:319-324.
- Aguilar Z, Akita RW, Finn RS, Ramos BL, Pegram MD, Kabbinavar FF, Pietros RJ, Pisacane P, Sliwkowski MX, Slamon DJ. 1999. Biologic effects of heregulin/neu differentiation factor on normal and malignant human breast and ovarian epithelial cells. *Oncogene*. 18:6050-6062.
- Ahmed N, Thompson EW, Quinn MA. 2007. Epithelila-Mesenchymal interconversions in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas: an exception to the norm. *J. Cell. Physiol.* 213:581-588.
- Amstrup J, Novak I. 2003. P2X7 receptor activates extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 independently of Ca²⁺ influx. *Biochem.* 374:51-61.
- Arellano RO, Woodward RM, Miledi R. 1996. Ion channels and membrane receptors in follicle-enclosed *Xenopus* oocyte. *Ion Channels*. 4:203-259
- Arellano RO, Garay E, Miledi R. 1998. Cl⁻ currents activated via purinergic receptors in *Xenopus* follicles. *Am. J. Physiol.* 274:C333-C340.

Arellano RO, Martínez-Torres A, Garay E. 2002. Ionic currents activated via purinergic receptors in the cumulus cell-enclosed mouse oocyte. *Biol. Reprod.* 67:837-846.

Arellano RO, Garay E, Vazquez-Cuevas F. 2009. Functional interaction between native G protein-coupled purinergic receptors in *Xenopus* follicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106:16680-16685.

Arellano RO, Robles-Martínez L, Serrano-Flores B, Vázquez-Cuevas F, Garay E. 2011. Agonist-activated Ca(2+) influx and Ca(2+)-dependent Cl(-) channels in *Xenopus* ovarian follicular cells: functional heterogeneity within the cell monolayer. *J. Cell. Physiol.* doi:10:1002/jcp.24046 [Epub ahead of print]

Auersperg N, Woo MMM. 2004. Development and differentiation of ovarian surface epithelium: cues for the basis of its malignant potential. p 579-586. Adashi EY, Leung PCK. *The Ovary* 2nd Edition New York: Elsevier.

Auersperg N, Wong ASC, Choi KC, Kang SK, Leung PC. 2001. Ovarian Surface Epithelium: Biology, Endocrinology, and Pathology. *Endocr.Rev.* 22: 255-288.

Bianco F, Ceruti S, Colombo A, Fumagalli M, Ferrari D, Pizzarani C, Matteoli M, Di Virgilio F, Abracchio Mp, Verderio C. 2006. A role for P2X7 in microglial proliferation. *J. Neurochem.* 99:745-758.

Bjersing L, Cajander S. 1975. Ovulation and the role of the ovarian surface epithelium. *Experientia.* 31:605-608.

Bradford MD, Soltoff SP. 2002. P2X7 receptors activate protein kinase D and p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK) downstream of protein kinase C. *Biochem. J.* 366:745-755.

Bradley HJ, Browne LE, Yang W, Jiang LH. 2011. Pharmacological properties of the rhesus macaque monkey P2X7 receptor. *Br . J. Pharmacol.* 164:743-754.

Bagowski C, Stein-Gertach M, Choidas A, Vilrich A. 1999. Cell-type specific phosphorylation of threonines T654 and T669 by PKD defines the signal capacity of the EGF receptor. *EMBO J.* 18:5567-5576.

Burnstock G. 1978. A basis for distinguish two types of purinergic receptor. In cell membrane receptors for drugs and hormones: A multidisciplinary approach (Straub, R. W. and Bolis L. eds.). pp 107-118. Raven Press.

Burnstock G, Kennedy C. 1985. Is there a basis for distinguish two types of P2-purinoceptor?. *Gen. Pharmacol.* 16:433-440.

Burnstock G. 2006. Purinergic signaling. *J. Pharmacol.* 147:S172-S181.

Burnstock G. 2006. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends. Pharmacol. Sci.*27:166-176.

Chambard JC, Lefloch R, Pouyssegur J, Lenarmand P. 2007. ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim.Biophys. Acta.* 1773:1299-1310.

Chang HL, MacLaughlin DT, Donahoe PK. 2009. Somatic stem cells of the ovary and their relationship to human ovarian cancers. StemBook, ed. The stem Cell Research Community.StemBook, doi/10.3824/stembook.1.43.1.

Cheng JC, Klausen C, Leung PCK. 2010. Hidrogen peroxide mediates EGF-induced down regulation of E-cadherin expression via p-38 MAPK and Snail in human ovarian cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 24:1569-1580.

Choi J, Park SY, Joo CK. 2007. Transforming growth factor-beta 1 represses E-cadherin production via slug expression in lens epithelial cells. *Inves. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48:2708-2718.

Chou MM, Hou W, Johnson J, Graham LK, Lee MH, Chen CS, Newton AC, Schaffhausen BS, Toker A. 1998. Regulation of protein kinase C zeta by PI3 kinase and PKD-1. *Curr. Biol.* 8:1069-1077.

Citri A, Skaria KB, Yarden Y. 2003. The deaf and the dumb: the biology of ErbB2 and ErbB3. *Exp. Cell. Res.* 289:54-65.

Civetta MT, Civetta JD. 2011. Carcinogénesis. *Salud Pública Mex.* 53:405-414.

Coddou C, Yan Z, Obsil T, Hudobro-Toro JP, Stojilkovic SS. 2011. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol. Rev.* 63:641-683.

Colgin DC, Murdoch WJ. 1997. Evidence for a role of the ovarian surface epithelium in the ovulatory mechanism of the sheep: secretion of urokinase-type plasminogen activator. *Anim. Reprod. Sci.* 47:197-204.

Costa-Junior HM, Sarmiento F, Coutinho-Silva R. 2011. C terminus of the P2X7 receptor: treasure hunting. *Purinergic Signal.* 7:7–19.

Cowden DKD, Symowicz J, Ning Y, Gutiérrez E, Fishman DA, Adley BP, Stack MS, Hudson LG. 2008. Matrix metalloproteinase 9 is a mediator of epidermal growth factor-dependent E-cadherin loss in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 68:4606-4613.

Di Virgilio F, Ferrari D, Adinolfi E. 2009. P2X(7) a growth promoting receptor-implications for cáncer. *Purinergic Signal.* 5:251-256.

Donnelly-Roberts DL, Namovic MT, Han P, Jarvis MF. 2009. Mammalian P2X7 receptor pharmacology: comparison of recombinant mouse, rat and human P2X7 receptors. *Br. J. Pharmacol.* 157:1203–1214.

Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. 2009. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr. Rev.* 30:624-712.

El-Moatassim C, Dubyak GR. 1992. A novel pathway for the activation of phospholipase D by P2X2 purinergic receptors in BACL-215 macrophages. *J. Biol. Chem.* 267:23664-23673.

Erb L, Liao Z, Seye CI, Weissman GA. 2006. P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch.* 452:552-562.

Faria RX, Reis RAM, Casabulho CM, Alberto AVP, De Farias FP, Henriques-Pons A, Alves LA. 2009. Pharmacological properties of a pore

induced by raising intracellular Ca^{2+} . *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 297:C28-C42.

Faria RV, Casabulho CM, Reis RAM, Alves LA. 2010. Large-conductance channel formation is regulated through distinct intracellular signaling pathways in peritoneal macrophages and 2BH4 cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 328:73-87.

Ferrari D, Los M, Bauer MKA, Wandenabeele P, Wesselburg S, Schulze-Osthoff K. 1999. P2X7 purinoreceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. *FEBS Lett.* 447, 71-75.

Folkins AT, Saleemuddin A, Garret LA, Garber JE, Muto MG, Tworoger SS, Crum CP. 2009. Epidemiologic correlates of an ovarian cortical inclusion cyst (CICs) support a dual precursor pathway to pelvic epithelial cancer. *Gynecol. Oncol.* 115:108-111.

Frago LM, Pañeda C, Dickson SL, Hewson AK, Argente J, Chowen JA. 2002. Growth hormone (GH) and GH releasing peptide-6, increases brain insulin-like growth factor-1, expression and activate intracellular signaling pathways involved in neuroprotection. *Endocrinology.* 143:4113-4122.

Gendron FP, Neary JT, Theiss PM, Sun GY, González FA, Weissman GA. 2003. Mechanisms of P2X7 receptor mediated ERK 1/2 phosphorylation in human astrocytoma cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 289:2571-2581.

Godwin AK, Testa J, Handel L, Lui Z, Vanderveer LA, Tracey PA, Hamilton TC. 1992. Spontaneous transformation of rat ovarian surface epithelial cells implicates repeated ovulation in ovarian cancer etiology and is associated with clonal cytogenetic changes. *J. Natl. Cancer Inst.* 84:592-601.

Gougeon A. 2004. Dynamics for human follicular growth, morphologic, dynamic and functional aspects: p 25-38. Adashi EY, Leung PCK. *The Ovary*. 2nd Edition. New York: Elsevier.

Greig AV, Linge C, Healy V, Lim P, Clayton E, Rustin MH. 2003. Expression of purinergic receptors in non-melanoma skin cancers and their functional roles in A431 cells. *J. Invest. Dermatol.* 121:315–327.

Hedden L, Benes CH, Soltoff SP. 2011. P2X(7) receptor antagonists display agonist-like effects on cell signaling proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1810:532-542.

Hudson LG, Moss NM, Stack MS. 2009. EGF-receptor regulation of matrix metalloproteinases in epithelial ovarian carcinoma. *Future Oncol.* 5:223-338.

Jacques-Silva MC, Rodnigh R, Lenz G, Liao Z, Kong Q, Tran M, Kang Y, González FA, Weissman GA, Neary JT. 2004. P2X7 receptors stimulate AKT phosphorylation in astrocytes. *Br. J. Pharmacol.* 141:1106-1117.

Juárez-Espinoza Berenice. 2006. Expresión de receptores purinérgicos durante la foliculogénesis en mamíferos. Tesis de maestría. Maestría en Neurobiología. INB- UNAM.

Kamada S, Blackmore PF, Oehninger S, Gordon K, Hodgen GD. 1994. Existence of P2-purinoceptors on human and porcine granulosa cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78:650-656.

Kantak SS, Kramer RH. 1998. E-cadherin regulates anchorage-independent growth and survival in oral squamous cell carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 273:16953-16961.

Kantak SK, Choi KC, Cheng KW, Nathwani PS, Auersperg N, Laung PCK. 2000. Role of gonadotropin-releasing hormone as an autocrine growth factor in human ovarian surface epithelium. *Endocrinology.* 141:78-80.

Kawate T, Michel JC, Birdson WT, Gouaux E. 2009. Crystal structure of the ATP gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature.* 460:592-598.

Kim JW, Dang CV. 2006. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res.* 66:8927-8930.

Kruk PA, Uitto VJ, Firth JD, Dedhar S, Auersperg N. 1994. Reciprocal interactions between human ovarian surface epithelial cells and adjacent extracellular matrix. *Exp. Cell. Res.* 215:97–108.

Lara-Mejía Adan. 2012. Expresión de los receptores purinérgicos P2Y2, P2Y4, y P2Y6 en las células normales y transformadas del epitelio ovárico superficial de mamífero. Tesis de Maestría. Maestría en Ciencias Neurobiología. INB-UNAM.

Lee CS, Bae YS, Lee SD, Suh PG, Ryu SH. 2001. ATP induced mitogenesis is modulated by phospholipase D2 through extracellular signal regulated protein kinase dephosphorilation in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Neurosci. Lett.* 313:117-120.

Leung PCK, Choi J. 2007. Endocrine signaling in ovarian surface epithelium and cancer. *Hum. Reprod. Update.*13:143-162.

Li X, Zhou L, Feng YH, Abdul-Karim FW, Gorodeski GI. 2006. The P2X7 receptor: A novel biomarker of the uterine epithelial cancers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15:1906-1913.

Li M, Zhou TH, Gao Y, Zhang N, Li JC. 2007. Ultrastructure and estrogen regulation of the lymphatic stomata of ovarian bursa in mice. *Anatom. Rec. (Hoboken).* 290:1195-1202.

Liu X, Surprenant A, Mao HJ, Roger S, Xia R, Bradley H, Jiang LH. 2008. Identification of key residues coordinating functional inhibition of P2X7 receptor by zinc and copper. *Mol. Pharmacol.* 73:252-259.

López-Castrejón G, Young MT, Meseguér J, Surprenant A, Mulero V. 2007. Characterization of ATP-gated P2X7 receptors in fish provides new insights into the mechanism of release of leader less cytokine interleukin-1 β . *Mol. Immunol.* 44:1286-1299.

McClellan M, Kievit P, Auersperg N, Rodland K. 1999. Regulation of proliferation and apoptosis by epidermal growth factor and protein kinase C in human ovarian surface epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 246:471-479.

Mistafa O, Ghalali A, Kadekar S, Högberg J, Stenius U. 2010. Purinergic receptor-mediated AKT depends on pleckstrin homology domain leucine-rich repeated phosphatase, calcineurin, protein phosphatase 2A and PTEN phosphatases. *J. Biol. Chem.* 285:27900–27910.

Murdoch WJ, McDonnell AC. 2002. Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis. *Reproduction.* 123:743-750.

North RA, Surprenant A. 2000. Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40:563-580.

Okamoto S, Okamoto A, Nikaido T, Saito M, Takao M, Yanaihara N, Takakura S, Ochiai K, Tanaka T. 2009. Mesenchymal to epithelial transitions in the human ovarian surface epithelium focusing on inclusion cysts. *Oncol. Rep.* 21:1209-1214.

Osterholzer H, Streibel EJ, Nicosia SV. 1985. Growth effects of protein hormones on cultured rabbit ovarian surface epithelial cells. *Biol. Reprod.*, 33:247–258.

Panenka W, Jijon H, Herx LM, Armstrong JN, Feighan D, Wei T, Yong VW, Ransohoff RM, MacVicar BA. 2001. P2X7 like receptor activation in astrocytes increases chemokine monocyte chemoattractant protein-1 expression via mitogen activated protein kinase. *J. Neurosci.* 21:7135-7142.

Pelegrin P, Surprenant A. 2006. Panexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 beta release by ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J.* 25:5071-5082.

Pelegrin P. 2011. Many ways to dilate the P2X7 receptor pore. *Br. J. Pharmacol.* 163:908-911.

Pellegatti P, Raffaghello L, Bianchi G, Piccardi F, Pistora V., Di Virgilio F. 2008. Increased level of extracellular ATP at tumor sites in vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS ONE.* 3:e2799.

Phelps SLB, Schorge JO, Peyton MJ, Shigematsu H, Xiang LL, Miller DS, Lea JS. 2008. Implications of EGFR inhibition in ovarian cancer cell proliferation. *Gynecol. Oncol.* 1091:411-417.

Raghuanam GV, Pathak N, Jain D, Panwar H, Pandey H, Jain SK, Mishra PK. 2010. Molecular mechanisms of isocyanate induced oncogenic transformation in ovarian epithelial cells. *Reprod. Toxicol.* 30:377-386.

Ratchford AM, Baker OJ, Camden JM, Rikka S, Petris MJ, Seve CI, Erb, L, Weissman GA. 2010. P2Y2 nucleotide receptors mediate metalloprotease dependent phosphorylation of epidermal growth factor receptor and ErbB3 in human salivary gland cells. *J. Biol. Chem.* 285:7545-7555.

Ravelick V, Burnstock G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50:413-492.

Rodríguez GC, Berchuck A, Whitaker RS, Schollossman D, Clarke-Pearson DL, Bast RCJ. 1991. Epidermal growth factor receptor expression in normal ovarian cancer epithelium and ovarian cancer. II Relationships between receptor expression and response to epidermal growth factor. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 164:745-750.

Salamanca CM, Maines-Bandiera SL, Leung PC, Huy L, Auersperg N. 2004. Effects of epidermal growth factor/hydrocortisone on the growth and differentiation of human ovarian surface epithelium. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 11:241-251.

Saldaña C, Vázquez-Cuevas F, Garay E, Arellano RO. 2009. Epithelium and/or theca are required for ATP-elicited K⁺ current in follicle enclosed *Xenopus* oocytes. *J. Cell. Physiol.* 202:814-821.

Schulz TJ, Thierbach R, Voigt A, Diewes G, Mietzner B, Steinberg P, Pfeiffer AFH, Ristow M. 2006. Induction of oxidative metabolism by mitochondrial furataxin inhibits cancer growth Otto Warburg revisited chemistry. *J. Biol. Chem.* 281: 977-981.

Scodelaro BP, Santillán G, Boland R. 2010. ATP stimulates the proliferation of MCF-7 cells through the PI3K/Akt signaling pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* 499: 40–48.

Scully RE. 1995. Pathology of ovarian cancer precursors. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 23:208-218.

Shemon AN, Sluter R, Wiley JS. 2007. Rotterlin inhibits P2X(7) receptor-stimulated phospholipase D activity in chronic lymphocytic leukaemia B-lymphocytes. *Immunol. Cell. Biol.* 85:68-72.

Siemens CH, Auersperg N. 1988. Serial propagation of human ovarian surface epithelium in tissue culture. *J. Cell Physiol.* 134:347-356.

Slater M, Danieletto S, Gidley-Baird A, Teh LC, Barden JA. 2004. Early prostate cancer detected using expression of non-functional cytolytic P2X7 receptors. *Histopathology.* 44: 206–215.

Slater M, Danieletto S, Pooley M, Cheng TL, Gidley-Baird A, Barden JA. 2004. Differentiation between cancerous and normal hyperplastic lobules in breast lesions. *Breast Cancer Res. Treat.* 83:1–10

Solini A, Cuccato S, Ferrari D, Santini E, Gulinelli S, Callegari MG, Dardano A, Faviana P, Madec S, Di Virgilio F, Monzani F. 2007. Increased P2X7 Receptor Expression and Function in Thyroid Papillary Cancer: A New Potential Marker of the Disease?. *Endocrinology.* 149:389–396

Stefano L, Rössler OG, Griesemer D, Hoth M, Their G. 2007. P2X(7) receptor stimulation upregulates Egr-1 biosynthesis involving a cytosolic Ca²⁺ rise, transactivation of the EGF receptor and phosphorylation of ERK and Elk-1. *J. Cell. Physiol.* 23:36-44.

Sun SH, Lin LB, Hung AC, Kuo JS. 1999. ATP-stimulated Ca²⁺ influx and phospholipase D activities of rat brain derived type-2 astrocyte cell line RBA-2 are mediated through P2X7 receptors. *J. Neurochem.* 73:334-343.

Swanson KD, Reigh C, Landreth GE. 1998. ATP-stimulated activation of the mitogen activated protein kinases through ionotropic P2X7 purinoreceptors in PC12 cells. *J. Cell. Chem.* 273:19965-19971.

Testa J, Getts L, Salazar H, Liu Z, Handel LM, Godwin AK., Hamilton TC. 1994. Spontaneous transformation of rat ovarian surface epithelial cells results in well to poorly differentiated tumors with a parallel range of cytogenetic complexity. *Cancer Res.* 54:2788-2884.

Van Niekerk CC, Ramerkers FCS, Hansellaar AGJM, Aldeweireldt J, Poels LG. 1993. Change in expression of differentiation markers between normalovarian cells and derived tumors. *Am. J. Pathol.* 142:157-177.

Vanderhyden BC, Shaw TJ, Garson K, Tonary AM. 2004. Ovarian carcinogenesis, p 591-602. Adashi EY, Leung PCK. *The Ovary*. 2nd Edition. New York: Elsevier.

Vázquez-Cuevas FG, Juárez B, Garay E, Arellano RO. 2006. ATP-induced apoptotic cell death in porcine ovarian theca cells through P2X7 receptor activation. *Mol. Reprod. Develop.* 73:745-755.

Vazquez-Cuevas F, Zárate-Díaz E, Arellano R. 2010. Functional Expression and Intracellular Signaling of UTP-Sensitive P2Y Receptors in Theca-Interstitial Cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8:88.

Vázquez-Cuevas FG, Garay E, Martínez-Ramírez AS, Cruz-Rico A, García-Carrancá A, Pérez-Montiel D, Arellano RO. Functional expression of P2X7 receptors in ovarian surface epithelium from mouse and human. Enviado.

Warburg O. 1956. On the respiratory impairment in cancer cells. *Science.* 124:269-270.

Wang Q, Wang L, Feng YH, Li X, Zeng R, Gorodeski GI. 2004. P2X7 receptor-mediated apoptosis of human cervical epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 278:C1349-C1358.

Wong AST, Leung PCK. 2007. Role of endocrine and growth factors on the ovarian surface epithelium. *J. Obstet. Gynecol. Res.* 33: 3–16.

Zeineldin R, Roosemberg M, Ortega D, Buhr C, Chávez MG, Stack MS, Kusewitt DF, Hudson LG. 2006. Mesenchymal transformation in epithelial ovarian tumor cells expressing epidermal growth factor receptor variant III. *Mol. Carcinogenesis*. 45:851-860.

Zeineldin R, Muller CY, Stack MS, Hudson LG. 2010. Targeting the EGF receptor for ovarian cancer therapy. *J.Oncol*. 2010: 414676.

Zitelner HJ, Maines-Bandiera S, Schader JW, Auesperg N. 1993. Secretion of bioactive interleukin-1, interleukin-6 and colony-stimulation factors by human ovarian surface epithelium. *Biol. Reprod*. 49:635-641.

12. Lista de abreviaturas

[Ca ²⁺] _i	Concentración de calcio intracelular
A	Alanina
A43	A438079
A438079	Hidrocloruro de 3- [[5- (2,3-Diclorofenil)- 1H- tetrazol- 1- yl] metil] piridina
ADP	Adenosina difosfato
AKT	Proteína cinasa B
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BAPTA	1,2-Bis (2-aminofenoxi) etano o-N,N,N',N'- acido tetracético tetrakis (acetoximetil ester)
BBG	Azul brillante de Coomassie,
Bcl-2	Linfoma de células B 2. Familia de proteínas reguladoras de apoptosis.
bFGF	Factor de crecimiento fibroblástico básico
BSA	Albúmina sérica bovina
BzATP	Sal de 2' (3') -O- (4-Benzoilbenzoil) adenosina-5'- trifosfato tri (triethylamonio)
CA125	Antígeno de cáncer 125
Ca ²⁺	Ión calcio
CAOV-3	Línea celular de adenocarcinoma ovárico humanas
CO ₂	Dióxido de carbono
Da	Daltons

DAG	Diacilglicerol
DMEM	Medio Eagle modificado Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
E	Ácido glutámico
EC ₅₀	Concentración efectiva 50
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
Egr-1	Proteína de respuesta al crecimiento temprana 1
EMT	Transición epitelio mesénquima
ErbB 2, 3, 4	Familia de cuatro receptores estructuralmente relacionados con actividad de cinasa de tirosina
ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares
FasL	Ligando de la proteína Fas o Apo-1
Fas	Proteína con dominio citoplásmico de muerte celular
FLUO-4-AM	2-{{2-(2-{{5- [bis (carboximetil) amino]-2-metilfenoxi} etoxi)-4-(2,7-difluoro -6- hidroxil- 3-oxo- 3H-xanteno-9-il) fenil] (carboximetil) amino} ácido acético acetoximetil ester
FSH	Hormona folículo estimulante
GADS	Proteína adaptadora relacionada a GRB-2
GnRH	Hormona liberadora de las hormonas gonadotropinas
GRB2	Proteína de unión a receptor de factor de crecimiento 2
HEK293	Línea celular de riñón embrionario humanas
HGF	Factor de crecimiento hepático

HRP	Peroxidasa de rábano
IGF-1	Factor de crecimiento similar a insulina tipo 1
IL-1B	Interleucina 1B
Jak	Cinasa Janus
JNK	Cinasas N-terminal c-Jun
K ⁺	Ión potasio
K562	Línea celular de leucemia mieloide humanas
KGF	Factor de crecimiento de keratinocitos
KN	Solución Krebs normal
KN-62	(1-[N,O-bis(5-isoquinolinasulfonil)-N-metil-L-tiroisil]-4-fenilpiperazina)
LG14	Línea celular de linfoblastoma humanas
LH	Hormona luteinizante
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MG-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos
MMP-9	Metaloproteasa 9
MT-1-MMP	Subfamilia de metaloproteasas de membrana
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
MUC1	Mucina1
Na ⁺	Ión sodio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NFAT	Factor nuclear de células T activadas

NF- $\kappa\beta$	Factor nuclear kappa beta
OSE	Epitelio ovárico superficial
p21	Gen humano localizado en el cromosoma 6 que codifica para un inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina llamada CDKN1A
p38	Proteínas cinasas activadas por mitógeno, también llamadas RK o CSBP, hay cuatro tipos p38- α (MAPK14), p38- β (MAPK11), p38- γ (MAPK12), p38- δ (MAPK13).
p53	Gen humano localizado en el cromosoma 17 que codifica para un factor de transcripción nuclear.
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI3K	Fosfoinositol 3 cinasa
PKC	Proteína cinasa C
PKD	Proteína cinasa D
PLD	Fosfolipasa D
PPADS	(piridoxal fosfato-6-azofenil-2',4'- ácido disulfónico)
PR	Receptor de progesterona
PVDF	Polivinil-difluoruro
Pyk2	Cinasa de tirosina no-receptor de la familia Fak
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa
S	Serina
SBF	Suero bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sodio

SH3	Dominio homólogo a Src 3
SiRNA	RNA pequeño de interferencia
SKOV-3	Línea celular de adenocarcinoma ovárico humano
Src	Familia de cinasas de tirosina no-receptor que incluye nueve miembros
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
T	Treonina
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
UAF	Unidades arbitrarias de fluorescencia
uPA	Activador del plasminogeno tipo uroquinasa
W	Período de lavado
Y	Tirosina

13. Índice de figuras

Figura 1.- Epitelio superficial ovárico en un ovario de bovino	2
Figura 2.- Cistos de inclusión como resultado de los procesos de ovulación y por la edad avanzada	8
Figura 3.- Vista de la arquitectura del receptor P2X4 en paralelo con la membrana plasmática	11
Figura 4.- Expresión del receptor P2X7 en ovario humano sano y adenocarcinoma	18
Figura 5.- Incremento de Ca^{2+} intracelular en células derivadas del OSE por estimulación con BzATP	19
Figura 6.- BzATP promueve la fosforilación de las ERKs y no induce el procesamiento de caspasa	20
Figura 7.- Trazo representativo de las respuestas de incremento de Ca^{2+} intracelular en células SKOV-3	28
Figura 8.- Efecto del tratamiento de células SKOV-3 con BzATP, ATP y A438079 en el incremento de Ca^{2+} intracelular.....	29
Figura 9.- Efecto del antagonista A438079 en la fosforilación de ERKs en células SKOV-3.....	30
Figura 10.- Efecto de la concentración de BzATP en la fosforilación de ERKs en células SKOV-3	31
Figura 11.- Efecto del tiempo de estimulación del receptor P2X7 en la fosforilación de ERKs en células SKOV-3	32
Figura 12.- Efecto de la estimulación con BzATP en la fosforilación de AKT en células SKOV-3.....	33

Figura 13.- Efecto del agente quelante de calcio BAPTA-AM sobre la fosforilación de ERKs dependiente del receptor P2X7 en células SKOV-3	34
Figura 14.- Efecto del agente quelante BAPTA-AM en la movilización de Ca^{2+} intracelular en células SKOV-3	35
Figura 15.- Efecto del inhibidor de la actividad de cinasa de tirosina del EGFR AG1478 en la fosforilación de las proteínas ERK en células SKOV-3	37
Figura 16.- Efecto en la proliferación celular por estimulación del receptor P2X7 con BzATP en células SKOV-3	38