



Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₆ EN LAS
CÉLULAS NORMALES Y TRANSFORMADAS DEL EPITELIO SUPERFICIAL OVÁRICO
DE MAMÍFERO

Tesis que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias (Neurobiología)

Presenta
Biol. Adán Lara Mejía

Directores de tesis
Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas
Dr. Rogelio Arellano Ostoa

Campus Juriquilla, Querétaro. Enero 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 de Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Adán Lara Mejía, cuyo título es “Expresión de los receptores purinérgicos P2Y2, P2Y4 y P2Y6 en las células normales y transformadas del epitelio superficial ovárico de mamífero” 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.

Firma

Presidente
Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Secretario (Tutor)
Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas

Vocal
Dr. Carlos Saldaña

Suplente
Dr. Gerardo Rojas Piloni

Suplente
Dra. Stéphanie Thebault

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del programa

RESUMEN

El epitelio superficial ovárico (OSE) es una monocapa celular que recubre el ovario cuyas funciones principales son el mantenimiento y la reparación tisular posteriores a la ruptura folicular. En el contexto patológico representa el origen del 90% de los cánceres ováricos, esto puede ser debido a los constantes cambios estructurales que sufre en cada ciclo, aunado a su plasticidad fenotípica epitelio-mesenquimal lo que le confiere esa susceptibilidad. Para llevar a cabo sus funciones, el OSE es regulado a través de una variedad de señales químicas endócrinas así como parácrinas y autócrinas.

El sistema de señalización purinérgico está presente en una gran diversidad de tipos celulares donde funciona como transmisor regulando diferentes procesos celulares como la proliferación, la diferenciación, la apoptosis, y parece contribuir a establecer el nivel basal de la actividad de otros sistemas de señalización intracelular. Uno de los principales transmisores en el sistema purinérgico es el adenosín trifosfato (ATP), que señala uniéndose a receptores de membrana denominados P2X y P2Y. Los receptores P2Y son receptores acoplados a proteínas G (GPCR) que activan distintas señales intracelulares de acuerdo al tipo de proteína G acoplada. El sistema de señalización purinérgica ha sido involucrado en el desarrollo de procesos tumorigénicos, lo que llevó al planteamiento del problema del presente estudio que pretende investigar acerca de las características del sistema expresado en células del OSE.

Llevamos a cabo la caracterización funcional de receptores purinérgicos registrando las fluctuaciones de Ca^{2+} intracelular inducidas por la aplicación de agonistas selectivos en células de cultivo primario del OSE de ratón, en la línea celular derivada del OSE murino (MM14.Ov) y en células del carcinoma ovárico humano (SKOV3). Utilizando los valores máximos de la señal registrada por microscopia de fluorescencia, construimos curvas concentración-respuesta y calculamos las respectivas EC50s (concentración media máxima efectiva). El análisis reveló la expresión de receptores sensibles a uridín trifosfato (UTP) en las células OSE y en células MM14.Ov, que puede corresponder al receptor P2Y2 o al receptor P2Y4; y la expresión de receptores sensibles a uridín difosfato (UDP) en los 3 tipos celulares que podrían corresponder con

el receptor P2Y6. En las células SKOV3, los datos apoyan la idea de la expresión de dos poblaciones distintas de receptores que responden a UTP y/o UDP.

Además, por medio de inmunofluorescencia detectamos la expresión de los receptores P2Y2, P2Y4 y P2Y6 en los tres tipos celulares. La distribución de los receptores P2Y2 es distinta entre las células OSE y SKOV3 respecto a las MM14.Ov; para los otros receptores analizados con respecto a la localización sub-celular no hubo diferencias. Las diferencias observadas en la localización espacial de estos receptores, así las diferencias en la respuesta funcional a los diferentes agonistas purinérgicos, podría reflejar procesos con alteraciones fisiológicas; lo que coloca a los receptores purinérgicos como potenciales blancos terapéuticos.

SUMMARY

The ovarian surface epithelium (OSE) is a cell monolayer that lines the ovary and their main functions are the maintenance and tissue repair after follicular rupture. In the pathologic context represents the source of 90% of ovarian cancers this may due to the constant structural changes suffering in each ovulatory cycle, coupled with its epithelial-mesenchymal phenotypic plasticity which confers susceptibility. To carry out its functions, the OSE is regulated through a variety of hormonal chemical as well as paracrine and autocrine signals.

Purinergic signaling system is present in a wide variety of cell types where it functions as a transmitter, regulating many cellular processes such as proliferation, differentiation, apoptosis, and seems to help establish the baseline level activities of other intracellular signaling systems. One of the main transmitters in the purinergic signaling systems is the adenosín triphosphate (ATP), which signals by binding to cell membrane receptors called P2X and P2Y. The P2Y receptors are G protein coupled receptors (GPCR) that activate different intracellular signals in accord with a specific G protein. The purinergic signaling system has been implicated in develop tumorigenic processes, under this approach, the aim of this study is led to investigate the characteristics of the system expressed in OSE cells.

We perform the functional characterization of purinergic receptors by recording the cytosolic Ca^{2+} fluctuations induced by selective agonist application in cells in primary culture of mouse OSE, in the ovarian cell line of murine (MM14.Ov), and in the human ovarian carcinoma cell line (SKOV3). We use the maximum values of calcium responses to construct concentration-response curves and to obtain the respective EC_{50} (half maximal effective concentration) values. The analyses reveals a uridine triphosphate (UTP)-sensitive receptor expression in the OSE and MM14.Ov cells that may correspond to the P2Y2 or the P2Y4 receptors; and the expression of (uridine diphosphate) UDP-sensitive receptor in the three cellular types that may correspond to the P2Y6 receptor. In SKOV3 cells the data support the idea of the expression of two different receptor populations that reply to UTP and/or UDP.

In addition, by immunofluorescence labelling we detect the expression of the P2Y2, P2Y4 and P2Y6 receptors in the three cell types. The spacial distribution of P2Y2 receptors vary between the OSE/SKOV3 cells respect MM14.Ov cells; with no markedly differences in the other cases. The observed differences in the spatial localization of these receptors, as well as different responses to purinergic agonists may reflect alterations in physiological consequences, which places purinergic receptors as potential therapeutic targets.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------------|---|
| 2SUTP | 2-tio-uracil trifosfato |
| $\alpha_v\beta_2$ | integrina alfa v beta 2 |
| $\alpha_v\beta_3$ | integrina alfa v beta 3 |
| ΔF | incremento en la fluorescencia |
| A1 | receptor a adenosina tipo 1 |
| A2780 | línea celular de carcinoma ovárico |
| A2A | receptor a adenosina tipo 2A |
| A2B | receptor a adenosina tipo 2B |
| A3 | receptor a adenosina tipo 3 |
| AA | ácido araquidónico |
| Ado | adenosina |
| ADP | adenosín difosfato |
| Ap4A | dinucleótido de adenina |
| ATP | adenosín trifosfato |
| Bcl-2 | línea de células B de linfoma 2 |
| Bcl-xl | línea de células B de linfoma xl |
| Bg-1 | línea celular de carcinoma ovárico |
| B-Raf | proteína cinasa de serina/treonina |
| BRCA1 | gen supresor de tumores (cáncer de mama 1) |
| CA125 | glicoproteína |
| Caco-2 | línea celular de carcinoma de colón |
| CaOV3 | línea celular de carcinoma ovárico |
| cDNA | DNA complementario |
| cGMP | guanosín monofosfato cíclico |
| DAG | diacilglicerol |
| E2 | estradiol |
| ER | receptor a estrógenos |
| EC₅₀ | concentración media efectiva |
| EFO-21 | línea celular de carcinoma ovárico |
| EFO-27 | línea celular de carcinoma ovárico |
| ERK1/2 | cinasa regulada extracelularmente |
| F36P | línea celular derivada de leucemia |
| F_{Cl} | corriente de cloro rápida |
| FSH | hormona folículo estimulante |
| GnRHI | hormona liberadora de gonadotropina I |
| GnRHII | hormona liberadora de gonadotropina II |
| GPCR | receptor acoplado a proteína G |
| G_{io} | proteína G inhibidora de la adenilato ciclasa |
| G_{q/11} | proteína G tipo q |
| G_s | proteína G estimuladora de la adenilato ciclasa |
| GTP | guanosín trifosfato |
| hCG | gonadotropina coriónica humana |
| HCT29 | línea celular de carcinoma de colón 29 |
| HCT8 | línea celular de carcinoma de colón 8 |
| HL60 | línea celular de carcinoma ovárico |
| Hs578 | línea celular de carcinoma de mama |
| IC₅₀ | concentración media para inhibición |
| IOSE-29 | línea celular neoplásica ovárica |
| IOSE-29EC | línea celular pre-neoplásica ovárica |

| | |
|------------------------|--|
| IOSE80 | línea celular ovárica inmortalizada |
| IOSE80PC | línea celular ovárica inmortalizada |
| IP₃ | inositol trifosfato |
| JNK | cinasa N-terminal de la proteína c-Jun |
| KA | ácido kaínico |
| K-Ras | gen de proteína RAS (GTP-asa) |
| LH | hormona luteinizante |
| MCF-7 | línea celular de carcinoma de mama |
| MEC | matriz extracelular |
| MM14.Ov | línea inmortalizada de epitelio ovárico |
| mRNA | RNA mensajero |
| NA | noradrenalina |
| OSE | epitelio superficial del ovario |
| OVCAR-3 | línea celular de carcinoma ovárico |
| P1 | receptores purinérgicos tipo 1 |
| P2 | receptores purinérgicos tipo 2 |
| P2U-R | receptores purinérgicos de uridinas |
| P2X | receptores purinérgicos tipo 2X |
| P2Y | receptores purinérgicos tipo 2Y |
| p38 | proteína cinasa activada por mitógeno |
| P53 | gen de factor de transcripción nuclear |
| PA | activador plasminógeno |
| PBS | solución amortiguadora de fosfatos |
| PC-12 | línea celular de feocromocitoma |
| PKA | proteína cinasa A |
| PKC | proteína cinasa C |
| PLC | fosfolipasa |
| PLA₂ | fosfolipasa A2 |
| PLC | fosfolipasa C |
| PLCβ1 | fosfolipasa C beta 1 |
| PPADS | ácido 2,2-dimetil-propinoico 2-(2-cloro-6-metil amino purin-9-il)-2-(2,2-dimetil-propioniloximetil)-propil-éster |
| PTX | toxina <i>Pertussis</i> |
| RB2 | reactivo azul 2 |
| RGD | dominio arginina-glicina-aspartato |
| ROI | región de interés |
| RP | receptores purinérgicos |
| RT-PCR | reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa |
| SH-SY5Y | línea celular de neuroblastoma |
| SK-B3 | línea celular de carcinoma de mama |
| SKOV3 | línea celular de carcinoma ovárico |
| T47-D | línea celular de carcinoma de mama |
| TEM | transición epitelio-mesénquima |
| TM | transmembranal |
| TNFα | factor de necrosis tumoral alfa |
| TNP-ATP | trinitro fenil adenosín trifosfato |
| T-SV40 | antígeno T del virus 40 vacuolado de simio |
| UDP | uridín difosfato |
| UDPβS | uridín beta tiodifosfato |
| UpaU | dinucleótido de uridina |
| UTP | uridín trifosfato |

AGRADECIMIENTOS

A nuestra máxima casa de estudios: Universidad Nacional Autónoma de México

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
Becario No: 234192

A la Dirección General de Estudios de Posgrado UNAM
Becario No: 403016460

Técnico Académico, laboratorio de Neurofisiología Celular, INB, UNAM.
Dra. Edith Garay

Auxiliar de laboratorio
Sr. Horacio Ramírez Leyva

Unidad de posgrado, INB, UNAM
M. en C. Leonor Casanova Rico

Biblioteca:
Biblioteca, Centro Académico Cultural, UNAM Campus Juriquilla,
Coordinador: Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela

Bioterio:
Bioterio del Instituto de Neurobiología, UNAM Campus Juriquilla.
MVZ. José Martín García Servín

Computo:
Unidad de cómputo del Instituto de Neurobiología, UNAM Campus Juriquilla.
ISC. Ramón Martínez Olvera
ISC. Omar González Martínez

DEDICATORIA

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| I. RESUMEN | III |
| II. SUMMARY | IV |
| III. LISTADO DE ABREVIATURAS | VI |
| 1. INTRODUCCIÓN | 12 |
| 1.1 Comunicación purinérgica | 12 |
| 1.2 Mecanismos de acción de los sistemas purinérgicos | 13 |
| 2. ANTECEDENTES | 17 |
| 2.1 Receptores purinérgicos | 17 |
| 2.2 Receptores purinérgicos P2Y | 18 |
| 2.3 Receptores purinérgicos P2Y2 | 19 |
| 2.4 Receptores purinérgicos P2Y4 | 23 |
| 2.5 Receptores purinérgicos P2Y6 | 26 |
| 2.6 Epitelio superficial del ovario | 28 |
| 2.7 Fisiología del OSE y el ciclo ovulatorio | 30 |
| 2.8 Transición epitelio-mesénquima en el OSE | 32 |
| 2.9 Cistos de inclusión cortical en el ovario y el OSE | 33 |
| 2.10 Histopatología del OSE y carcinogénesis ovárica | 35 |
| 2.11 Marcadores del OSE y relación con la matriz extracelular | 37 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 39 |
| 4. HIPÓTESIS | 40 |
| 5. OBJETIVOS | 40 |
| 6. MATERIAL Y MÉTODOS | 41 |
| 6.1 Cultivo primario de células del epitelio superficial ovárico | 41 |
| 6.2 Líneas celulares derivadas del OSE | 44 |
| 6.3 Cargado de las células por el marcador fluorescente de Ca^{2+}_i | 46 |
| 6.4 Registro de la actividad celular por microscopía | 46 |
| 6.5 Adquisición de imágenes | 47 |
| 6.6 Análisis de secuencias de imágenes | 48 |
| 6.7 Inmunofluorescencia | 49 |
| 6.8 Diseño experimental | 50 |

| | |
|--|----|
| 7. RESULTADOS | 54 |
| 7.1 Respuestas inducidas por ATP, UTP o UDP en células del OSE | 54 |
| 7.2 Respuestas inducidas por ATP, UTP o UDP en células MM14.Ov | 54 |
| 7.3 Respuestas inducidas por ATP, UTP o UDP en células SKOV3 | 57 |
| 7.4 Detección de los receptores P2Y2 por inmunofluorescencia | 59 |
| 7.5 Detección de los receptores P2Y4 por inmunofluorescencia | 61 |
| 7.6 Detección de los receptores P2Y6 por inmunofluorescencia | 62 |
| 8. DISCUSIÓN | 64 |
| 8.1 Dinámica de Ca ²⁺ | 64 |
| 8.2 Expresión de receptores purinérgicos por inmunofluorescencia | 65 |
| 8.3 Respuestas purinérgicas en células del OSE | 66 |
| 8.4 Respuestas purinérgicas en células MM14.Ov | 67 |
| 8.5 Respuestas purinérgicas en células SKOV3 | 68 |
| 9. CONCLUSIONES | 72 |
| REFERENCIAS | 73 |
| LISTA DE FIGURAS | 87 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1- Comunicación purinérgica

La evolución de organismos ha sido posible, en gran medida, por el desarrollo de mecanismos que permiten interacciones con el entorno. Estos mecanismos están presentes en todos los sistemas biológicos procariotas y eucariotas a lo largo de la escala filogenética. La transducción de señales ambientales o procesos complejos que involucran el transporte y acople específico de moléculas señalizadoras, son el sustrato de la comunicación celular. Aún existe una amplia gama de sistemas de señalización que no se conocen en su totalidad.

La complejidad del procesamiento de la información dentro y entre organismos es notable en la comunicación endócrina y en la neurotransmisión en vertebrados y otros animales. Se ha observado el papel de algunas moléculas en la comunicación celular, las cuales fueron referidas clásicamente con funciones estructurales o en el metabolismo energético; tal es el caso de los nucleótidos de adenina y uridina. Los nucleótidos de adenina y de uridina juegan un papel muy importante en la fisiología celular participando en la síntesis de macromoléculas, en la modulación funcional de proteínas y en el metabolismo celular; pero además, pueden ser liberados por las células y actuar como transmisores químicos (Duybak y El-Moatassim, 1993; Rangel et al. 2007; von Kügelgen y Harden, 2011).

A finales de la década de los 20 en el siglo pasado, se realizó la primera descripción sobre la implicación funcional de los nucleótidos de adenina en el corazón de mamíferos (Drury y Szent-Györgyi, 1929). La participación de los nucleótidos como moléculas de señalización fue propuesta décadas después por Burnstock (1972); donde se planteó que éstas actuaban por medio de receptores de membrana plasmática, denominados receptores purinérgicos (RP) (Burnstock 1976). Algunas purinas fueron reconocidas entonces como las responsables de dicho fenómeno, y años más tarde, Kennedy y Burnstock mostraron por medio de métodos farmacológicos la existencia de al menos 2 tipos de RP (Kennedy y Burnstock, 1985).

Además de los nucleótidos de adenina, se ha identificado la participación de nucleótidos de uridina en la señalización celular (Häussinger et al. 1987), y se han sentado las bases para el reconocimiento de subclases de RP. Actualmente, se han clonado y caracterizado 7 subunidades de RP tipo canal-iónico activados por unión a ligando (receptores P2X) (North y Surprenant, 2000) y 8 receptores diferentes acoplados a GPCR (receptores P2Y) (Ralevic y Burnstock 1998).

La comunicación purinérgica juega un papel fundamental en virtualmente todos los tejidos y es evidente en tejidos con una gran dinámica o en constante regeneración. Se ha observado la participación del ATP y otros nucleótidos de adenina y uridina; en la determinación del destino celular y en la forma en que se induce a las células a la proliferación (Hassenklöver et al. 2010; Huwiler y Pfeilshifter, 1994; Morales-Ledesma et al. 2010), a la migración (Boucher et al. 2010), a la diferenciación (Delic y Zimmermann, 2010; Sak et al. 2003) o a la muerte celular programada (apoptosis) (Deli y Csernoch, 2008; Wang et al. 2004; Wang et al. 2005).

1.2 Mecanismos de acción de los sistemas purinérgicos

Existen notables diferencias fisiológicas entre los mecanismos de señalización en los que interviene cada subtipo de RP, como es el hecho de que los receptores P2X están involucrados en fenómenos de comunicación rápida. Por otra parte, los receptores P2Y han sido asociados a procesos tróficos o de largo plazo (Burnstock 2009; Stojilkovic et al. 2010).

Se ha descrito que las neuronas del sistema nervioso central poseen receptores P2X activados por ATP, por medio de los cuales se regula la respuesta sináptica rápida, y además poseen receptores P2Y que regulan tanto cambios lentos del potencial de membrana como la interacción con receptores para otros transmisores (Illes y Ribeiro, 2004). Existe evidencia de la participación de elementos purinérgicos en mecanismos involucrados con la regulación de la excitabilidad neuronal (Calvert et al. 2004) y en la señalización entre neuronas y glía, así como en el procesamiento de señales sensoriales (Aoyama et al. 2011; Calvert et al. 2004).

El papel de estos mecanismos de comunicación es de gran importancia en la transmisión sináptica (Westfall et al. 2002), en la inervación de glándulas u órganos como el ovario (Kulkarni et al. 1976; Lara y Belmar, 1991; Lara et al. 2002) o en la inervación del músculo liso (Kumari et al. 2003). Ejemplos de esto son la respuesta eléctrica en el músculo del útero de ratón, que reportaron Ninomiya y Suzuki (1983) como un efecto debido a la aplicación de ATP; o la interacción entre el ATP y moléculas presentes en las membranas de células uterinas de humano, observada por medio de ensayos de competencia en unión a radio-ligando (Rosca-Testoni et al. 1984).

Los estudios tempranos sobre los sistemas purinérgicos se enfocaron a la señalización a corto plazo (neurotransmisión y neuromodulación), pero recientemente existe un creciente interés en la señalización trófica ya que se ha mostrado una actividad preponderante de los RP en la proliferación, la diferenciación, la motilidad, la muerte, la regeneración y la reparación al daño celular; procesos básicos en condiciones fisiológicas y cuyas alteraciones se han relacionado con diversas patologías (Choi et al. 2006; Künzli et al. 2006; Nylund et al. 2007). La señalización purinérgica trófica también está fuertemente relacionada con la respuesta inflamatoria y en procesos derivados de ella como la migración, la apoptosis, o la restenosis (Burnstock 2009; Choi et al. 2003a; Nylund et al. 2004). Además, este tipo de activación celular está involucrada en la modulación de mecanismos como el transporte epitelial, la migración celular, la respuesta inmune, la regulación del volumen celular, entre otras (Burnstock, 2009; Hansen et al. 2008; Künzli et al. 2006; Robaye et al. 2003; Westfall et al. 2002).

Existe evidencia de la participación de estos sistemas en tejidos endoteliales como la aorta de ratón, donde Guns y colaboradores, identificaron además del ATP, al UTP como moléculas de señalización (Guns et al. 2006). La comunicación purinérgica participa en la regulación del tono vascular, donde el ATP es liberado como con-transmisor por los nervios simpáticos o a través del lumen vascular en respuesta a cambios en el flujo sanguíneo e hipoxia (Erlinge y Burnstock, 2008). El sistema purinérgico simpático puede ser muy similar al del sistema de renina-angiotensina-aldosterona, en sus efectos sobre la homeostasis y la regulación cardiaca; así como en la patofisiología del órgano central en este sistema (Morris et al. 2011). La síntesis de

nucleótidos extracelulares y la expresión de RP en el tejido cardiovascular se encuentran en fase de desarrollo clínico (Erlinge y Burnstock, 2008).

Se ha mostrado que la acción del ATP está delimitada por las ectonucleotidasas (Boucher et al. 2010; Dubyak y El-Moatassim, 1993; Stojilkovic et al 2010). La hidrólisis de ATP por las ectonucleotidasas no sólo termina su función de mensajero extracelular, sino también provee una vía para la generación de dos agonistas adicionales: el adenosín difosfato (ADP) y la adenosina (Ado), que actúan sobre algunos RP (Hess et al. 2009; Künzli et al. 2006; Stojilkovic et al. 2010).

Actualmente se sabe que muchos tipos celulares liberan ATP fisiológicamente en respuesta a distintos estímulos además de la distorsión mecánica o la hipoxia (Burnstock, 2009; Saldaña et al. 2008). Una fuente importante de ATP que actúa de manera autócrina y parácrina sobre los RP, surge de la lisis provocada a partir de la muerte o el daño celular propio o de células contiguas (Burnstock y Williams, 2000; Dubyak y El-Moatassim, 1993). El ATP extracelular al ser liberado por células contiguas dañadas, induce la transmisión de señales hacia y entre células circundantes (Block et al. 2010; Corriden et al 2010). Por ejemplo, Boucher y colaboradores (2010) mostraron que la aplicación de medio de cultivo proveniente de cajas conteniendo células epiteliales dañadas provocaba en células sanas una respuesta fisiológica. La explicación a este fenómeno es que el daño a las células epiteliales resulta en la liberación de ATP, que al actuar sobre los RP de las células sanas, promueve la movilización de Ca^{2+} intracelular, ya que los efectos son inhibidos por la aplicación de apirasa, un agente que degrada rápidamente el ATP (Boucher et al. 2010).

Electrofisiológicamente, se ha observado la generación de corrientes iónicas provocadas por la liberación de ATP. Por ejemplo, en ovocitos de *Xenopus leavis* acoplados a las células foliculares, la liberación de ATP de manera tanto basal como inducida mecánicamente, se evidencia por la generación de respuestas eléctricas nativas. En este modelo celular el ATP es liberado por el ovocito, el transmisor difunde hasta las células foliculares donde se une a RP específicos, generando una respuesta eléctrica que incluye una corriente de entrada rápida acarreada por Cl^- (F_{Cl}) (Saldaña et al. 2008).

Los sistemas purinérgicos representan una compleja red de comunicación extra e intracelular que incluye mecanismos de activación cruzada o transactivación entre distintas entidades proteínicas derivadas de la degradación de los propios RP o la participación de proteínas que intervienen en la comunicación cruzada con este sistema (Burnstock, 2009; von Kügelgen y Harden. 2011).

A nivel intracelular se han identificado múltiples procesos derivados de la activaci3n purinérgica sobre numerosas vías metab3licas como el caso de la glucog3n3lisis (Keppens y De Wulf, 1986); o sobre la activaci3n de distintas cascadas de señalizacion. La desregulaci3n de los sistemas purinérgicos puede tener implicaciones en la fisiopatología de diversos tejidos, por lo que el estudio de estos sistemas y el papel de los RP en la regulaci3n celular son de gran relevancia m3dica (Burnstock, 2009; Deli y Csernoch, 2008; Maehara et al. 1987; Stagg y Smyth, 2010).

2. ANTECEDENTES

2.1-Receptores purinérgicos

Los RP se han clonado y expresado en sistemas heterólogos, además, se han caracterizado a partir de diversos tejidos animales por diversos autores (Groschel-Stewart et al. 1999; North y Barnard, 1997; Surprenant y Pelegrin, 2006; Vázquez-Cuevas et al. 2006; von Kügelgen y Wetter, 2000).

Con base en evidencias farmacológicas se han propuesto dos familias de receptores a purinas; tipo 1 (P1) que son sensibles a Ado, y tipo 2 (P2) que son principalmente sensibles a ATP. A la fecha, se conocen 4 subtipos de receptores P1, denominados receptores A1, A2A, A2B y A3; todos estos receptores pertenecen a la superfamilia de GPCR (Fredholm, 2010). Los receptores P2 son clasificados en receptores tipo P2X de los cuales existen 7 subunidades que forman receptores-canal triméricos y 8 subtipos de GPCR que son llamados receptores P2Y (von Kügelgen y Harden, 2011). Algunos receptores P2 son sensibles a ADP y otros también son estimulados por pirimidinas principalmente el UTP y el UDP (Burnstock 2007). La idea de que además de los nucleótidos de adenina, los nucleótidos de uridina fungen como moléculas señalizadoras, ha sido ampliamente documentada y aceptada por diversos autores (Boeynaems et al. 1996; Communi y Boeynaems, 1996; Hassenklöver et al. 2010; Häussinger et al. 1987; Huwiler y Pfeilshifter, 1994).

Los miembros de la familia de receptores P2X se ensamblan en homo y heterotrímeros formando canales catiónicos operados por unión de ligando (North 2002; Ralevic y Burnstock, 1998). Su activación puede resultar en el influjo de Ca^{2+} y Na^{+} , y en el eflujo de K^{+} (Browne et al. 2010; Khak et al. 2001; MacKenzie et al 1999).

Los siete genes (P2X1-7) que codifican para las subunidades de receptores P2X presentan entre 30 y 50% de identidad en su secuencia de aminoácidos (Erb et al. 2006). La estructura predicha para las subunidades de los receptores P2X consiste en dos segmentos transmembranales (TM) TM1 y TM2, los cuales están involucrados en la apertura del canal y en la formación del poro iónico respectivamente. Estos segmentos, están separados por un asa extracelular que contiene sitios ampliamente conservados y

que corresponden a regiones involucradas en la glicosilación y el sitio de unión al ATP (Roberts et al. 2006; von Kügelgen y Wetter, 2000). Las regiones amino y carboxilo intracelular contienen sitios consenso de fosforilación para las proteínas cinasa A y C (PKA y PKC) (Tai et al. 2001).

2.2-Receptores purinérgicos P2Y

Han sido clonados 8 subtipos de receptores P2Y, y han sido denominados P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11-14. Los subtipos de receptores P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 y P2Y11 al ser activados por nucleótidos extracelulares (preferentemente ADP sobre receptores P2Y1, UTP/ATP para P2Y2; UTP en P2Y4; UDP para receptores P2Y6, y ATP para los receptores P2Y11), ejercen sus efectos a través de proteínas G heterotriméricas, las cuales son insensibles a las toxinas *Pertussis* (PTX) y del cólera (von Kügelgen y Harden, 2011). Estos receptores tienen preferencia de acoplamiento con las proteínas G del tipo q/11($G_{q/11}$) que en general estimulan la síntesis de inositol trifosfato/diacilglicerol (IP_3/DAG) a través de activar a la fosfolipasa C (PLC). El IP_3 actúa sobre receptores localizados en la membrana del retículo endoplásmico, promoviendo la liberación de Ca^{2+} desde estos reservorios intracelulares (Hansen et al. 2008; Hardie, 1996; Mikoshiba y Hattori, 2000).

Por otro lado los receptores P2Y12, P2Y13 y P2Y14 en su estado activo (preferentemente ADP sobre P2Y12 y P2Y13; y UDP-glucosa sobre P2Y14), se acoplan preferentemente a proteínas G inhibitoras de la adenilato ciclasa ($G_{i/o}$) que son sensibles a PTX (Lin y Lee, 1996). Esto por una parte disminuye la concentración citosólica del cAMP y en consecuencia la actividad de la PKA (Caler et al. 2000); y por otra parte, activa la fosfodiesterasa de monofosfato de guanosín cíclico (cGMP) (von Kügelgen y Harden, 2011).

Por medio de métodos de sustitución de residuos de aminoácidos (mutagénesis dirigida) y estudios comparativos sobre las estructuras cuaternarias de proteínas similares a estos receptores, se han establecido las bases para la descripción de regiones y dominios con papeles fisiológicos a nivel molecular; como lo son el reconocimiento e interacción con el agonista, o el reconocimiento de dominios de interacción con

proteínas citosólicas involucradas en la señalización intracelular. Por ejemplo, la tercer asa intracelular y el extremo carboxilo terminal, están relacionadas con el acople específico a la proteína G, y varía enormemente entre las secuencias de los distintos receptores P2Y clonados y funcionalmente expresados (von Kügelgen y Wetter, 2000).

Los receptores P2Y2, P2Y4 y P2Y6 responden además del ATP, a nucleótidos de uridina y sus efectos son provocados a través de proteínas $G_{q/11}$. Al igual que el ATP los nucleótidos de uridina pueden ser liberados por neuronas y células gliales, algunos de los papeles de estos nucleótidos se relacionan con la promoción del sueño, acciones antiepilépticas, en la memoria y en la plasticidad neuronal (Dobolyi et al. 2011). El estudio de la respuesta purinérgica de estos tres subtipos de receptores P2Y y su posible participación en el epitelio ovárico es poco conocida y es el objeto de estudio en el presente trabajo.

2.3-Receptores purinérgicos P2Y2

El receptor P2Y2, previamente descrito como P_{2U} ha sido clonado y caracterizado farmacológicamente a partir de tejidos o células humanas, caninas, porcinas, y murinas (Abbracchio et al. 2010; Lustig et al. 1993; Parr et al. 1994; Rice et al. 1995; Vázquez-Cuevas et al. 2011; Zambon et al. 2000). El ácido ribonucleico mensajero (mRNA) del receptor P2Y2 se ha detectado en una amplia diversidad de tipos celulares, por ejemplo, en el músculo esquelético de humano, en el corazón, el cerebro, linfocitos, macrófagos, la médula ósea y el pulmón (Moore et al. 2001). Este receptor se expresa funcionalmente en células epiteliales, músculo liso, células endoteliales, leucocitos, cardiomiocitos, osteoblastos y células derivadas del sistema nervioso central y periférico; incluyendo a las células de Schwann, neuronas corticales de rata, oligodendrocitos, astrocitos corticales y del asta dorsal, astrocitos inmortalizados, células de astrocitoma, entre muchos otros (Lustig et al. 1993; Parr et al. 1994; Rice et al. 1995).

El receptor P2Y2 se activa casi de manera equipotente por UTP y ATP (Hou et al. 2000); y no se activa por nucleótidos difosfatados (ADP o UDP) (Nicholas et al. 1996). Ha sido reportado que existe una disminución en la potencia sobre el receptor P2Y2 debida a sustituciones del anillo uracilo en el UTP. El dinucleótido de adenina Ap4A es un potente

agonista para el receptor P2Y4 de la rata y menos potente para el receptor P2Y2. Otros dinucleótidos de uridina como UpaU, activan también con gran potencia al receptor P2Y2. La dependencia de la potencia en varios receptores P2Y sobre el número de unidades fosfato asociadas a las series de dinucleótidos indica que existe un óptimo en el tetrafosfato (Abbracchio et al. 2010). Los agonistas del receptor P2Y2 son de gran importancia clínica en el tratamiento de alteraciones pulmonares u oftálmicas y posiblemente en el cáncer (Choi et al. 2003a; Künzli et al. 2006; von Kügelgen y Harden, 2011). El orden de potencia en la respuesta de distintos agonistas del receptor P2Y2 evaluados en diferentes epitelios es el siguiente: ATP = UTP >> ADP = UDP (Dubyak 2003).

Se ha observado que la substitución de aminoácidos básicos en los segmentos TM6 y TM7 por aminoácidos neutros, disminuye la potencia del ATP y del UTP, lo que sugiere que estos dominios juegan un papel importante en la unión del dominio con carga negativa del nucleótido agonista (Erb et al. 2001). La señal de blanco de este receptor se encuentra en su primer asa extracelular (Qi et al. 2002). El receptor P2Y2 puede desensibilizarse en varios tipos celulares. Estudios por mutagénesis dirigida indican que la supresión de los supuestos sitios de fosforilación en el dominio carboxilo terminal disminuye la desensibilización e internalización dependiente del agonista (Garrad et al. 1998).

No existe un antagonista selectivo para los receptores P2Y2 a la fecha. La suramina es un antagonista competitivo no selectivo y tiene un débil efecto sobre los receptores P2Y2, con un valor para la concentración media efectiva de inhibición (IC_{50}) de 48 μ M (Abbracchio et al. 2010).

Los receptores P2Y2 se acoplan de manera preferente a la proteína $G_{q/11}$ que activa a la $PLC\beta_1$ que promueve la síntesis de IP_3 y DAG, que corresponden a un segundo mensajero para la liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares (Putney et al. 1989) y activador de la PKC respectivamente (Gomperts et al. 2009).

El ATP y el UTP inducen la quimiotaxis, o migración celular dirigida, a través de la estimulación de los receptores P2Y2. Este receptor tiene un dominio de unión a las

integrinas denominado „RGD“ (arginina-glicina-aspartato) que está presente en su primer asa extracelular, éste permite la interacción selectiva con las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$; acción que es eliminada por la mutación de esta secuencia (Erb et al. 2001). Este dominio también es necesario para la respuesta del receptor sobre la movilización de Ca^{2+} intracelular por el acople con la proteína $G_{i/o}$, pero no así del acople con la proteína G_q (Bagchi et al. 2005). La vía de las integrinas activada por este y otros mecanismos, regula procesos de angiogénesis y respuestas inflamatorias incluyendo la proliferación, la migración, la adhesión y la infiltración; fenómenos asociados a la metástasis tumoral (Zhang et al. 2002).

Por otra parte, la activación del receptor P2Y2, incrementa la síntesis y/o liberación de ácido araquidónico (AA), de prostaglandinas y de óxido nítrico (NO) (Lustig et al. 1993; Xing et al. 1999; Xu et al. 2002). En células en cultivo primario derivadas de astrocitos murinos, se ha observado que el receptor P2Y2 puede mediar la activación de la PKC y de la cinasa regulada por señal extracelular (ERK1/2), tanto de manera dependiente, como también independiente de Ca^{2+} ; y que pueden en consecuencia, activar la fosfolipasa A_2 (PLA₂) y conducir a la producción de AA, el cual es precursor de los eicosanoides, prostaglandinas y leucotrienos (Balsinde et al. 2002; Gendron et al. 2003; Xu et al. 2003). Además de la vía de ERK1/2, la activación del receptor P2Y2 puede inducir la fosforilación de otras cinasas como JNK y p38, activadas por estrés. Y puede promover a la alta la expresión de genes relacionados con la supervivencia como Bcl2 y Bcl-xl como se ha mostrado en las células de astrocitoma humano, y genes que regulan el crecimiento neurítico en células PC-12 (Chorna et al. 2004).

La activación de este receptor promueve también la activación de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) (Hou et al. 2000; Koshiba et al. 1997; Turner et al. 1998; Seye et al. 2002). Algunos estudios revelan que la activación de la MAPK mediada por el receptor P2Y2 en fibroblastos rat-1 y en células PC-12 es dependiente de la transactivación del receptor P2Y2 con el receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR) a través de una vía dependiente de Src/Pyk2 (Soltoff, 1998; Soltoff et al. 1998). Otros estudios han mostrado que la activación de los receptores P2Y2 puede inducir la proliferación y/o la migración de los queratinocitos epidermales humanos, las células

tumorales del epitelio pulmonar, las células de glioma y las células del músculo liso (Greig et al. 2003; Schafer et al. 2003; Seye et al. 2002; Tu et al. 2000; Wilden et al. 1998).

Otro de los procesos fisiológicos en los que interviene el receptor P2Y2 es la movilización transmembranal de iones. Se ha observado que el ratón *knock-out* para el receptor P2Y2 presenta un defecto en la secreción de iones debido a la estimulación por nucleótidos en células epiteliales de las vías respiratorias (Cressman et al. 1999). Esto confirma el papel del receptor P2Y2 en la regulación del transporte iónico transmembranal (Robaye et al. 2003). Además, se ha mostrado que la activación del receptor tiene un efecto sobre las corrientes de calcio tipo N en neuronas (Filippov et al. 1997; Brown et al. 2000). Electrofisiológicamente, se ha observado que al activar P2Y2 se incrementa la secreción de Cl⁻ y se inhibe la absorción de Na⁺ en células epiteliales. Lo que implica tener potencial relevancia en el tratamiento de la fibrosis quística, un padecimiento que es causado por defectos en el gen de un canal aniónico epitelial (Clarke y Boucher. 1992; Parr et al. 1994; Clarke et al. 2000; Kellerman et al. 2002).

Existen varios procesos sobre la fisiología celular que involucran a los receptores P2Y2, por ejemplo, su participación en la inhibición de la formación de hueso en los osteoblastos (Hoebertz et al. 2002), o en funciones como la inducción del procesamiento de la proteína precursora amiloide dependiente de α -secretasa, observado en células de astrocitoma humano, lo que sugiere un papel de la activación de este receptor como neuroprotector (Camden et al. 2005).

La activación del receptor P2Y2 tiene efectos sobre la progresión del ciclo celular, como ha sido mostrado en células del músculo liso, donde se promueve el ciclo celular de la fase G₁ a las fases S y M (Malam-Souley et al. 1996; Miyagi et al. 1996). De manera importante para el presente estudio, las evidencias sobre su expresión en estados fisiológicos y patológicos sugieren que puede estar implicado en la generación de eventos transformantes neoplásicos, metaplásicos (Seye et al. 2002) y en la carcinogénesis sobre distintos tejidos como el páncreas (Künzli et al. 2006), el colón (Coutinho-Silva et al. 2005; Hopfner et al. 1998; Nylund et al. 2007), el pulmón (Schafer

et al. 2003), próstata (Janssens y Boeynaems. 2001), glándula mamaria (Dixon et al. 1997) y del ovario (Choi et al. 2003a; Schultze-Mosgau et al. 2000).

Consistente con el papel de los receptores P2Y2 en la proliferación celular, la expresión de su mRNA está regulada a la baja durante la diferenciación celular (Martin et al. 1997). Sin embargo, existen notables diferencias entre la activación de diversas cascadas de señalización en diversos tejidos bajo distintas condiciones fisiológicas. Lo que sugiere que el papel del receptor sobre la proliferación, la apoptosis y la diferenciación celular, debe ser explicada en función de su posible interacción con otras entidades moleculares, interacciones que permanecen inciertas a la fecha.

2.4 Receptores purinérgicos P2Y4

El receptor P2Y4 ha sido clonado y caracterizado a partir de DNA genómico del humano (Communi et al. 1995; Nguyen et al. 1995), de la rata (Bogdanov et al. 1998; Webb et al. 1998) y del ratón (Lazarowski et al. 2001; Suárez-Huerta et al. 2001). El receptor P2Y4 presenta un porcentaje de identidad en su secuencia de aminoácidos de 83% entre el homólogo del humano y el de la rata (Bogdanov et al. 1998), de 82% entre el de humano y el de ratón; y de 95% entre el de ratón y el de la rata (Suárez-Huerta et al. 2001). El mRNA del receptor P2Y4 ha sido identificado en el hígado, intestino, estómago, vejiga y pulmones del ratón (Suárez-Huerta et al. 2001).

El UTP es un activador endógeno potente para el receptor P2Y4 humano recombinante (Nicholas et al. 1996), mientras que el ATP se comporta como un antagonista competitivo sobre este receptor (Brunschweiler y Müller, 2006; Herold et al. 2004; Kennedy et al. 2000). Por el contrario, en roedores el ATP es un agonista (Abbracchio et al. 2010; von Kügelgen y Harden. 2011). El receptor P2Y4 no se activa por los nucleótidos difosfatados UDP o ADP, y la suramina no ejerce un papel antagonista sobre este receptor incluso en altas concentraciones. El ácido 2,2-dimetil-propiónico 3-(2-cloro-6-metilaminopurin-9-il)-2-(2,2-dimetil-propioniloximetil)-propil éster (PPADS) reduce la respuesta máxima del agonista en el receptor P2Y4 de humano, pero no tiene efecto sobre el de rata (Charlton et al. 1996; von Kügelgen y Harden. 2011). Los receptores

P2Y4 recombinantes de rata y ratón son activados equipotentemente por ATP y UTP (Bogdanov et al. 1998; Herold et al. 2004; Webb et al. 1998).

Aunque existen ligeras diferencias, es difícil establecer distinciones farmacológicas importantes entre los receptores P2Y2 y P2Y4, por lo que es necesario valerse de diversas herramientas para reconocer e identificar plenamente entre un subtipo y otro. Las diferencias entre la respuesta a antagonistas como la suramina, la cual tiene efecto sobre los receptores P2Y2 pero no sobre P2Y4, es un ejemplo de ello. El PPADS por otra parte, actúa como un antagonista débil sobre los receptores P2Y4 pero es inefectivo sobre los receptores P2Y2 (Charlton et al. 1996).

Los receptores P2Y2 y P2Y4 de la rata han sido expresados de forma heteróloga en el ovocito de *Xenopus laevis*, donde se encontró que estos receptores exhiben diferente sensibilidad ante distintos antagonistas de los receptores P2 mostrando que el orden de potencia para el receptor P2Y2 es la siguiente: suramina >> PPADS = reactivo azul 2 (RB2) > TNP-ATP; y para el receptor P2Y4 el orden de potencia de los distintos antagonistas es: RB2 >> suramina > PPADS > TNP-ATP (Wildman et al. 2003).

Se han observado también diferencias en la potencia de la selectividad de algunos agonistas como el derivado de UTP, 2-tio-UTP. La aplicación de este agonista induce una respuesta en las células de astrocitoma 1321N1 que expresan los receptores P2Y2, P2Y4 y P2Y6; con un valor de EC_{50} (concentración del agonista media efectiva) = 50 nM, y que corresponde alrededor de 30 veces más potente sobre los receptores P2Y2 que para los receptores P2Y4 (El-Tayeb et al 2006). En diferentes tejidos epiteliales se ha observado que existen diferencias en la potencia de los agonistas del receptor P2Y4 entre el humano y el de roedor, donde este orden de potencia es: UTP >> ATP, UDP = ADP, y UTP = ATP >> UDP = ADP respectivamente (Dubyak. 2003).

Un estudio sobre receptores quiméricos humano/rata P2Y4, mostró que los determinantes estructurales del agonismo contra el antagonismo por el ATP, se localizan en el dominio amino terminal y en la segunda asa extracelular. Ese análisis mutacional reveló que son tres residuos en la segunda asa extracelular los que contribuyen a determinar las propiedades del ATP como agonista/antagonista (Herold et al. 2004).

El mRNA del receptor P2Y4 ha sido detectado por medio de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en la placenta y abundantemente en el intestino de humano. Se ha reconocido además en células endoteliales de la vena umbilical, leucocitos, cardiomiocitos fetales y varias líneas celulares derivadas del hígado (Communi et al. 1999).

En la rata, el mensajero del receptor es más evidente en el corazón y cerebro de neonatos que en el adulto (Webb et al. 1998; Cheung et al. 2003). En adultos está presente en el sistema plexo coroide/ventricular y fuertemente en la glándula pineal, así como en astrocitos (Webb et al. 1998). En ratón, se mostró que el mensajero de P2Y4 es abundante en el estómago, hígado e intestino (Suárez-Huerta et al. 2001). Los mayores niveles del receptor P2Y4 se localizan en la médula ósea roja, monocitos, linfocitos e hígado (Abbracchio et al. 2006).

Este receptor señala principalmente a través de las proteínas $G_{q/11}/PLC \beta$, además de la movilización de Ca^{2+} (Communi et al. 1995; Filippov et al. 2003). La respuesta del receptor P2Y4 recombinante de humano es parcialmente inhibida por la PTX (Communi et al. 1996). Además, en neuronas simpáticas inyectadas con cDNA a partir de la secuencia del receptor P2Y4, el UTP inhibe la corriente de Ca^{2+} tipo N, tal inhibición es mitigada aplicando PTX o expresando las subunidades $\beta\gamma$ de transducina, lo que indica un papel de las subunidades $\beta\gamma$ de proteínas $G_{i/o}$ en la función del receptor P2Y4, el cual puede además controlar la secreción de K^+ en células vestibulares (Marcus et al. 2001).

El receptor P2Y4 ha sido identificado en diferentes líneas celulares como la derivada del neuroblastoma (SH-SY5Y) donde se ha asociado a la inducción de la diferenciación y la muerte celular (Cavaliere et al. 2005). En células de líneas derivadas de carcinoma ovárico (IOSE-29, IOSE-29EC, y OVCAR-3) (Choi et al. 2003a, Choi et al. 2003b); y en células de líneas celulares derivadas de cáncer de mama (Hs578, MCF-7, SK-Br3 y T47-D), en las que se ha propuesto que juegan un papel pro-proliferativo (Dixon et al. 1997). Se ha observado la expresión del receptor P2Y4 en células derivadas de carcinoma de colon HT-29 con efectos anti-proliferativos y pro-apoptóticos (Hopfner et al. 1998; Nylund et al. 2004), y en HCT8 y Caco-2 con efectos pro-proliferativos y pro-apoptóticos (Coutinho-Silva et al. 2005). Este receptor ha sido identificado en monocitos de leucemia

(líneas celulares F-36P y HL-60), donde se ha observado un efecto sobre el arresto celular a través de la proteína $G_{i/o}$ teniendo consecuencias negativas sobre la proliferación y promoviendo la apoptosis (Yoon et al. 2006).

El papel de este receptor y sus efectos pro o anti-proliferativos en células derivadas de carcinomas muestra diferencias entre células derivadas de tejido u otro (Deli y Csernoch. 2008), por lo que es necesario realizar estudios sobre el papel fisiológico de este receptor en tejidos en estados patológicos y en diferentes estadios neoplásicos o transformantes.

2.5-Receptores purinérgicos P2Y6

Los receptores P2Y6 de diferentes especies además de responder a ATP presentan mayor afinidad por el UDP (Chang et al. 1995; Communi et al. 1996; Lazarowski et al. 2001). El receptor p2y3 que también es sensible a UDP, es el ortólogo en aves del receptor P2Y6 en mamíferos. El uridín β -tiodifosfato (UDP β S) es un potente agonista del receptor P2Y6 y menos susceptible a la degradación que el UDP; actualmente no existe un antagonista selectivo para estos receptores (Abbracchio et al. 2010; Li et al. 1998; Webb et al. 1998). La respuesta en el incremento de IP₃ por la aplicación de UDP sobre el receptor P2Y6 recombinante es insensible a PTX lo que sugiere que se presenta un acople del receptor P2Y6 a la proteína $G_{q/11}$ (Chang et al. 1995; Robaye et al. 1997). Sin embargo, el incremento en el cAMP mediado por el receptor P2Y6 ha sido reportado, probablemente esto es un efecto indirecto mediado por prostaglandinas, al observarse que este es un efecto parcialmente suprimido por indometacina, un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas (Köttgen et al. 2003).

Los transcritos de P2Y6 han sido encontrados en el bazo, timo, placenta, intestino y leucocitos, en el pulmón, estómago, intestino y aorta de mamíferos (Chang et al. 1995; Communi et al. 1996). El UDP puede actuar como factor de crecimiento en estos tipos celulares (Hou et al. 2002). Una característica única de este receptor es que presenta una lenta desensibilización e internalización en comparación con otros receptores P2Y (Robaye et al. 1997; Brinson y Harden, 2001). Se ha sugerido que esto puede ser consecuencia de la estructura de la proteína en la que se observa una corta secuencia

en el carboxilo terminal del receptor, contiene una sola treonina y además; carece de las serinas 333 y 334 importantes en la fosforilación, la desensibilización y la internalización dependiente de UTP en este receptor (Brinson y Harden, 2001).

El receptor P2Y6 ha recibido atención en su papel como importante regulador de la inflamación en donde su estimulación con UDP promueve la liberación y producción de quimiocinas pro-inflamatorias, en algunos tipos celulares (Kim et al. 2011). Se ha observado que existe un incremento selectivo de este receptor en células endoteliales después de la estimulación inflamatoria *in vitro*, utilizando el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) como activador (Brännström et al. 1995; Blackburn 2011, Oshimi et al. 1999).

Durante la respuesta sistémica inflamatoria las moléculas de superficie expresadas por células endoteliales, han sido fuertemente implicadas en la orquestación de la respuesta inmune, y en diversos estudios se ha demostrado que existe una liberación elevada de nucleótidos durante la inflamación aguda. Riegel y colaboradores (2011) demostraron una inducción selectiva del receptor P2Y6 durante la respuesta inflamatoria, lo cual corresponde con estudios previos realizados por distintos métodos como el análisis por RT-PCR, *Western blot*, o inmunofluorescencia; donde se ha confirmado una dependencia en la dosis y en el tiempo de la inducción de receptores P2Y6 por medio de TNF- α o lipopolisacárido (LPS) (Brännström et al. 1995; Blackburn, 2011; Riegel et al. 2011).

Inoue (2007) encontró que el UDP aplicado exógenamente promueve la fagocitosis a través de los receptores P2Y6 dependiente de la concentración, y que el daño neuronal causado por la aplicación de ácido kaínico (KA), regula al alta la expresión del receptor P2Y6 en la microglia. El daño neuronal evocado por KA resulta en el incremento de UTP, el cual es inmediatamente metabolizado en UDP *in vivo* e *in vitro*. Entonces el UDP puede ser una molécula difusible que señala la crisis de las neuronas dañadas a la microglia, activando posteriormente a la fagocitosis. Estas evidencias sugieren que el ATP/ADP atrae a la microglia y subsecuentemente reconocen al UDP como señal de inducción de la fagocitosis. El ATP/ADP no es capaz de activar los receptores P2Y6, y el UDP tampoco actúa sobre los receptores P2Y12, entonces los nucleótidos de adenina y de uridina, deben regular la motilidad microglial, en una forma coordinada de quimiotaxis

y fagocitosis (Inoue, 2007; Inoue et al. 2009). También se ha mostrado que el receptor P2Y6 puede ser un mediador de la respuesta inmune innata contra la invasión de patógenos a través del reclutamiento de monocitos/macrófagos (Zhang et al. 2011).

Se ha mostrado que el receptor P2Y6 está implicado en la respuesta inflamatoria en diversos tejidos, sin embargo, su papel en el OSE permanece desconocido. Este receptor ha sido observado en líneas celulares derivadas de distintos tejidos como el pulmón, donde podría estar participando en la regulación a la alta de la proliferación (Schafer et al. 2003); en neuroblastoma, teniendo un efecto sobre la inducción de la diferenciación (Cavaliere et al. 2005); en la próstata (Janssens y Boeynaems. 2001); en monocitos de leucemia, con un efecto pro-apoptótico (Yoon et al. 2006) y en el melanoma maligno (White et al. 2005).

El papel de estos receptores sobre la carcinogénesis ha quedado de manifiesto en múltiples sistemas biológicos, sin embargo, se desconoce la posible expresión purinérgica y su papel en líneas celulares derivadas de carcinoma en tejidos ováricos. En nuestro laboratorio, se ha observado actividad purinérgica en ovocitos de ratón (Arellano et al. 2002), y en células teca-intersticiales (Vázquez-Cuevas et al. 2006, 2010), donde se ha comprobado la presencia funcional de este tipo de receptores. Sin embargo, la expresión de los receptores purinérgicos en las células del OSE permanece poco estudiada.

2.6-Epitelio superficial del ovario

El OSE es el mesotelio pélvico que recubre al ovario (Auersperg et al. 2001) (Figura 1), está formado por una monocapa celular epitelial de origen mesenquimático (Leroy-Dudal et al. 2008). El mesoderma se segrega durante el desarrollo embrionario en un mesénquima pluripotente y el epitelio celómico (mesotelio peritoneal). El OSE se diferencia después de la invaginación del mesotelio celómico sobre las crestas gonadales (Colgin y Murdoch, 1997; Murdoch y McDonnell. 2002). Este origen mesodérmico está compartido con el epitelio del sistema urogenital y con el de la corteza adrenal (Murdoch y McDonnell, 2002).

Estas células superficiales forman un continuo con el mesotelio del ligamento ovárico (mesovario) y el peritoneo, y se mantienen unidas lateralmente por desmosomas y complejos de uniones estrechas y uniones comunicantes (Ahmed et al. 2006; Murdoch y McDonnel, 2002). Se encuentra separado del estroma ovárico por una lámina basal (membrana basal), que a su vez se sitúa sobre una capa de tejido conectivo rico en colágena, la túnica albugínea (intersticio cortical ovárico) (Wong y Leung 2007).

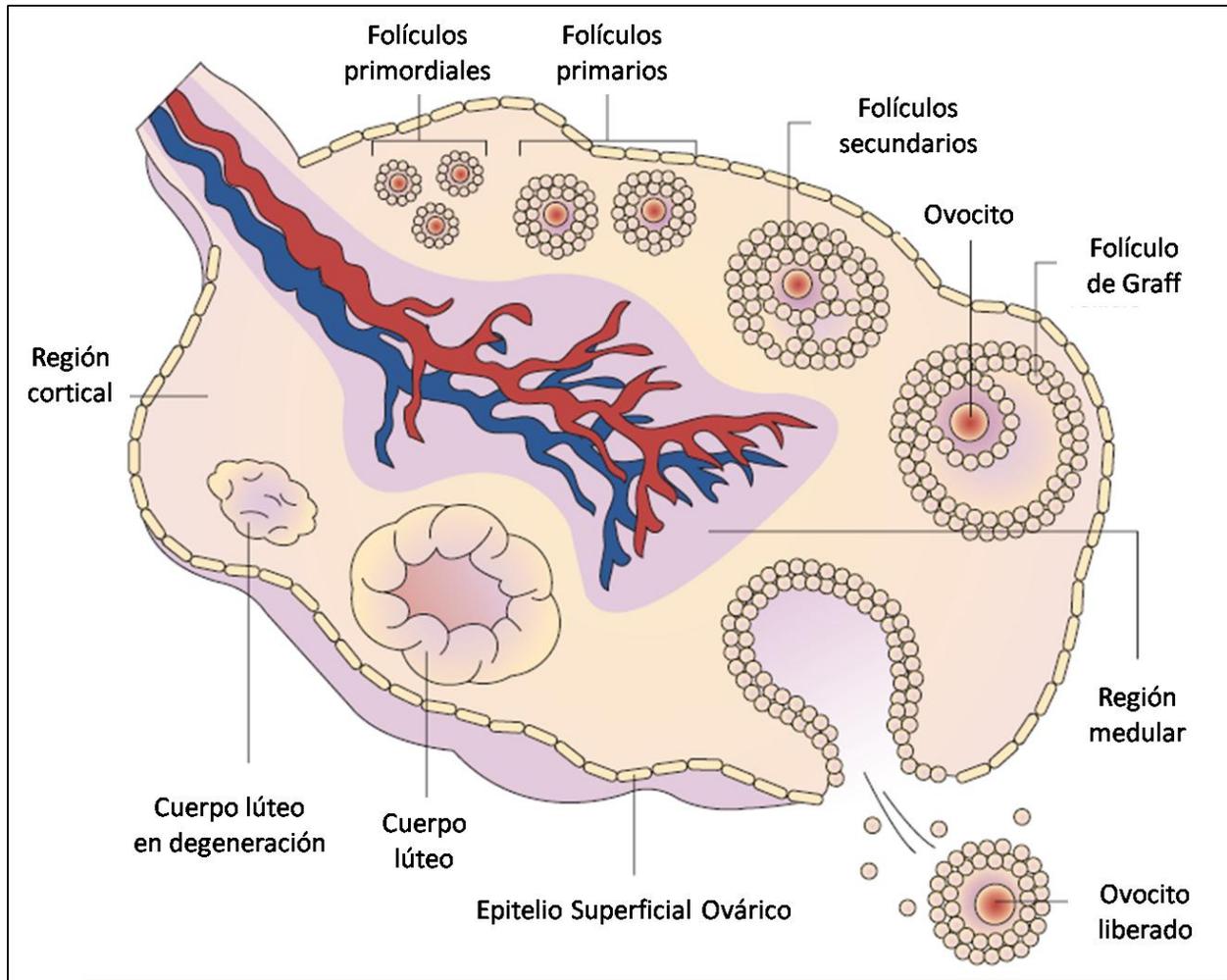


Figura 1. Ovario adulto de humano. La superficie libre del ovario está cubierta por una monocapa de células epiteliales, el epitelio superficial del ovario (OSE). El ovario presenta una región cortical mayor y una menor región medular compuesta de células tipo fibroblasto y células de músculo liso. La región medular contiene grandes vasos sanguíneos. La región cortical presenta los folículos en los que se contiene a cada ovocito. Los folículos primarios resultan del crecimiento de folículos primordiales, luego se desarrollan como folículos secundarios y maduran en folículos de Graff. Durante la ovulación la superficie ovárica se rompe cuando el ovocito es liberado. Después de la ovulación los remanentes del folículo se convierten en el cuerpo lúteo, una estructura glandular que secreta hormonas sexuales femeninas (modificado de Naora y Montell, 2005).

Este epitelio presenta múltiples cambios a lo largo de la vida: en la gestación humana, el OSE fetal cambia de una forma simple epitelial plana-cuboidal a un epitelio papilar multiestratificado, pero que se revierte a una monocapa (Auersperg et al. 2001; Murdoch y McDonnel, 2002; Okamura et al. 2006). Se ha propuesto que las señales para el crecimiento del OSE fetal incluyen hormonas esteroides intragonadales, como sugiere la evidencia morfológica sobre la diferenciación de células del estroma, hacia la morfogénesis del OSE (Auersperg et al. 2001).

Como ya ha sido mencionado el ovario está inervado por componentes simpáticos y parasimpáticos del sistema nervioso autónomo, donde el componente simpático podría ser la fuente de ATP y de neurotransmisores como la noradrenalina (NA) (Burnstock, 2007). Se ha sugerido que el ATP podría ser secretado además por las células del folículo y actuar de manera autócrina y/o parácrina, como se ha observado en otros tipos celulares donde la estimulación mecánica, entre otros estímulos, podría también inducir la liberación de ATP (Arellano et al. 2009; Saldaña et al. 2008).

2.7 Fisiología del OSE

Se ha establecido un papel del OSE en el mecanismo de la ruptura folicular durante la ovulación. Estas células epiteliales contribuyen a la ovulación por medio de la lisis y reconstrucción de la corteza ovárica (Ahmed et al. 2006; Ahmed et al. 2007), el mecanismo de la inducción gonadotrópica de este proceso fue inicialmente apoyada por el hecho de que la degeneración del tejido conectivo comenzaba en el OSE y avanzaba a través de la pared folicular. Las enzimas proteolíticas liberadas por gránulos citoplásmicos de las células epiteliales, aparentemente degradan la túnica albugínea y la teca subyacente, debilitando entonces la pared folicular apical (Murdoch y McDonnel. 2002).

Ha sido mostrado que la ovulación *in vitro* de la rana (Schuetz y Lessman, 1982) y de la oveja *in vivo* (Colgin y Murdoch, 1997), es abatida por la remoción del OSE. El OSE sufre también periodos de intensa proliferación, e invade el estroma ovárico como cordones de células, para asociarse con la ovogonia y contribuir a la formación del folículo primordial (Kruk et al. 1994).

Uno de los modelos del ciclo ovulatorio y de la participación del OSE, propone que existe estimulación gonadotrópica que propicia la liberación del activador plasminógeno (PA) por el OSE en el folículo pre-ovulatorio. El OSE produce además enzimas lisosomales sobre el folículo que se encuentra en estrecha cercanía con él. Lo anterior lleva a un incremento del activador PA que en consecuencia activa a las colagenasas latentes y libera al TNF- α de las células de la teca. El TNF- α induce la expresión de las metaloproteinasas de matriz (MMP) y otras respuestas inflamatorias. Entonces, la colagenólisis precede la ovulación y es acompañada por la exfoliación y desplazamiento de una región discreta del OSE cercana al domo de la ruptura del folículo ovulatorio (Ahmed et al. 2006; Brännström et al. 1995; Murdoch y McDonnel, 2002).

La dependencia de las células del OSE al anclaje o a diferentes interacciones con la matriz o sustrato, pueden influir sobre el destino celular, por lo que factores microambientales como el sustrato en el que se encuentran las células, así como la inducción mediada por hormonas como las gonadotropinas que son secretadas por las células subyacentes al OSE en el tejido intacto, pueden tener una gran implicación fisiológica. Algunos de los activadores extracelulares que también deben tomarse en consideración en conjunto con la activación purinérgica son el AA que participa en la transactivación de estas y otras proteínas (Azzi et al. 1992), hormonas como la (hormona folículo estimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH) y la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG).

El OSE expresa receptores a la LH/hCG y a la FSH, se ha mostrado que estas hormonas gonadotrópicas, están implícitas en el desarrollo de carcinomas epiteliales ováricos al ser capaces de estimular la proliferación celular del OSE normal, lo anterior ha sido observado en células derivadas del OSE y provenientes de varias especies (Kuroda et al. 2001; Osterholzer et al. 1985a y 1985b; Zheng et al. 1996). Se ha observado por medio de RT-PCR la presencia de distintos receptores como LH y FSH en células inmortalizadas derivadas del OSE (IOSE80 y IOSE80PC) y en células derivadas de 5 líneas cancerosas incluidas células SKOV3 (Choi et al. 2006), por lo que también deben de ser considerados estos factores en los estudios comparativos entre células normales y transformadas derivadas del OSE (Choi et al. 2006). Otras de las

interacciones con RP se da con receptores a hormonas como el receptor a estrógenos, el cual es positivo en el cáncer. Las células del OSE humano, exhiben una formación glandular cuando son cultivadas con células de estroma endometrial en ambiente enriquecido con estrógenos (Hua et al. 1995).

El fenotipo versátil del OSE se refleja entre diversos procesos, en las interacciones célula-matriz extracelular (MEC) en cultivos celulares. La comparación de cultivos que han sido preservados en diferentes sustratos revela que estas células pueden formar monocapas cohesivas al plástico, donde las células producen componentes de MEC característicos de la membrana basal epitelial (laminina y colágena tipo IV), así como del estroma (colágena tipo II y III), esto ha sido observado también en células montadas sobre vidrio (Kruk et al. 1994). Las células colonizan estos tipos de matrices como agregados multicelulares, mientras que en los geles de colágena regulan la conversión morfológica epitelio-mesénquima (Kruk et al. 1994).

El metabolismo de la colágena es un prerrequisito para la distensión folicular y la ruptura ovulatoria (Murdoch y McDonnel. 2002). La colágena intersticial tipo I es el principal sostén de la pared folículo-ovárica. Las membranas basales que bordean la capilaridad de la teca y la cual las células de la granulosa y del OSE comparten, es colágena de tipo IV. Las colagenasas de mamífero pertenecen a la familia de MMP que truncan las cadenas polipeptídicas de la colágena en sitios cercanos al extremo amino; estas enzimas comparten muchos atributos funcionales pero difieren en la especificidad por el sustrato (Bröström et al. 1995; Schuetz y Lessman, 1982).

2.8 Transición epitelio-mesénquima en el OSE

Durante la fase post-ovulatoria, algunas de las células epiteliales exfoliadas son inducidas a apoptosis, mientras otras forman parte de la reparación del daño de la superficie. El OSE puede experimentar un proceso denominado transición epitelio-mesénquima (TEM) en respuesta a los mediadores inflamatorios inducidos por la ovulación y migrar de la superficie del ovario hacia el estroma, o puede quedar atrapado en la ruptura folicular, donde puede estar expuesto al factor de crecimiento epidermal

(EGF) y otros factores inductores de la TEM derivados del fluido folicular, sangre, plaquetas y células luteales (Ahmed et al. 2007).

La plasticidad fenotípica de los epitelios normales varía enormemente. Esta plasticidad fenotípica comparte propiedades de mesénquima cuando son cultivadas en dos capas de matriz extracelular y gel de colágena. Entre los ejemplos más dramáticos de plasticidad es la TEM la cual es frecuente en organismos inferiores y durante la ontogenia en vertebrados. Las conversiones morfológicas han sido reportadas comúnmente, pero no exclusivamente en epitelios derivados del mesodermo como las células mesoteliales de la pleura, las células epiteliales y el OSE. El OSE adulto de humano co-expresa características epiteliales y mesenquimales como las queratinas y las vimentinas. Se ha sugerido que la expresión de un fenotipo tal es modulada por diversos factores y la interacción con la MEC (Kruk et al. 1994).

Las células del OSE secretan MEC componente de membrana basal (laminina, colágena tipo IV) y del estroma (colágena tipo I y III). La capacidad del OSE para secretar matriz de estroma puede estar relacionada estrechamente con el desarrollo del estroma ovárico el cual subyace el epitelio celómico en la cresta gonadal del embrión. La capacidad del OSE para producir MEC estromal le permite contribuir a la reparación del daño postovulatorio. La capacidad del OSE para forma matriz de colágena independiente del estroma, contribuye a las células de tejido conectivo, siendo entonces un factor importante en la progresión neoplásica del ovario (Kruk et al. 1994).

2.9 Cistos de inclusión cortical en el ovario y el OSE

Los cistos de inclusión son invaginaciones del OSE dentro de la corteza ovárica superficial (cistos de inclusión cortical) (Feeley y Wells 2001, Pothuri et al. 2010). Estos sitios de gran potencial transformante neoplásico, son considerados como lesiones precursoras de los carcinomas ováricos. Se ha mostrado que la TEM se presenta durante la formación de los cistos de inclusión (Deligdisch et al. 1995; Fleming et al. 2007, Okamoto et al. 2009), donde la desregulación en la TEM puede desencadenar procesos de transformación a través de la ganancia del fenotipo mesenquimático (Bagnato y Rosanò. 2007; Kruk et al. 1994).

Las invaginaciones y los cistos de inclusión se forman en el estroma cortical después del ciclo ovulatorio, consecuentemente, la ovulación puede ocasionar la pérdida de la integridad del OSE y ser una predisposición hacia alteraciones genéticas (Katabuchi y Okamura et al. 2003). Tanto los carcinomas ováricos como la endometriosis ovárica se originan del OSE y de los pequeños cistos corticales (Auersperg et al. 2001; Feeley y Wells 2001; Okamoto et al. 2009; Pothuri et al. 2010; Scully 1995). Los cistos de inclusión son comunes en ambos ovarios donde se presentan tumores epiteliales malignos (Okamura y Katabuchi, 2001).

Por medio de técnicas de genética molecular, combinada con análisis morfológicos de tejidos ováricos normales humanos y en fases tempranas del cáncer ovárico, Pothuri et al. (2010) demostraron que frecuentemente los carcinomas ováricos se generan en estos cistos de inclusión epitelial. Este grupo mostró que los cistos de inclusión epiteliales ováricos benignos presentan una firma de expresión génica cuasi-neoplásica, en comparación con la superficie del epitelio; especialmente, sobre genes que afectan la transducción de señales implicadas en el control del ciclo celular y en la formación del uso mitótico. Los cistos ováricos presentan un índice mayor de proliferación en comparación con la superficie del epitelio. Todo esto lleva a la conclusión de que los carcinomas ováricos epiteliales frecuentemente son precedidos por alteraciones precursoras displásicas, en donde la proliferación aumenta y la muerte celular apoptótica disminuye.

Se ha mostrado que los tumores ováricos que derivan de la transformación maligna del OSE, emergen lentamente a partir de lesiones precursoras que han sido denominadas cistadenomas. En estos tumores se han identificado mutaciones en K-Ras y B-Raf, moléculas que están implicadas en procesos apoptóticos y cuya alteración deriva en procesos proliferativos y neoplásicos (LeRoy-Dudal et al., 2008). Se ha observado que existe un porcentaje alto de mutaciones en algunos genes supresores de tumores que están asociados a esta carcinogénesis, como mutaciones en BRCA1 que han sido asociadas a cáncer de mama y de ovario (Ouchi et al., 1998). Recientemente, el grupo de Clark-Knowles (2009) ha reportado que mediante la inactivación condicional de genes

supresores de tumores como BRCA1 y p53, es posible desarrollar transformación de células adyacentes con mayor rapidez y la generación de leiomioma.

2.10-Histopatología del OSE y carcinogénesis ovárica

Se ha reportado que de los tipos de carcinomas ováricos, alrededor del 90% se originan en el OSE a partir de los cistos de inclusión cortical (Aoki et al. 2000; Feeley y Wells, 2001). Estos cistos de inclusión han sido referidos como sitios potenciales de transformación neoplásica por diversos autores (Auersperg et al., 2001; Deligdisch et al., 1995; Pothuri et al., 2010). Las primeras observaciones sobre la relación del OSE y el carcinoma ovárico, surgieron a partir de estudios histopatológicos e inmunocitoquímicos en especímenes clínicos, ya que no existían modelos experimentales adecuados para el estudio de estos neoplasmas. Los modelos animales no eran disponibles hasta hace poco, ya que a excepción de lo que ocurre en gallina y el humano no se había observado la generación de tumores ováricos epiteliales a partir del OSE en otras especies (Auersperg et al., 2001). Sin embargo, la capacidad de células del OSE en cultivo para generar adenocarcinomas ha sido demostrada experimentalmente en otros trabajos (Auersperg et al., 1999; Ong et al., 2000).

Los cánceres epiteliales de ovario representan una patología grave, recurrente y de consecuencias fatales. Están asociadas con una pobre prognosis principalmente debido a un diagnóstico tardío donde se adquiere quimio-resistencia. El microambiente de los tumores consiste en componentes vasculares, fibroblástico, de células inflamatorias de respuesta inmune y de MEC. El desarrollo multi-sitio del cáncer ovárico epitelial implica el establecimiento de un diálogo molecular y celular permanente entre las células cancerosas, las células del estroma y las proteínas de matriz. Estas interacciones involucran citocinas, moléculas de adhesión y sistemas proteolíticos (Leroy-Dudal et al. 2008).

Existe una clara asociación entre la carcinogénesis y la expresión y función de los receptores purinérgicos. Por ejemplo, se ha observado la sobre-expresión de los receptores P2Y2 y P2Y4 en células cancerosas del colon en humano (Nylund et al. 2007). Künzli y colaboradores reportaron un incremento significativo de los transcritos

para los receptores P2X7, P2Y2 y P2Y6 en el tejido pancreático con inflamación crónica (pancreatitis) y en el carcinoma pancreático (Künzli et al. 2006).

La información sobre el papel del sistema de comunicación purinérgico en células del OSE es limitada, aunque se ha mostrado la expresión endógena de receptores como el P2Y2 en células de cáncer ovárico humano (EFO-21 y EFO-27) (Schultze-Mosgau et al. 2000). En líneas celulares humanas pre-neoplásicas (IOSE29), neoplásicas (IOSE-29EC) y en la línea celular de adenocarcinoma ovárico (OVCAR3) derivadas del OSE se ha observado la presencia de receptores P2Y sensibles a nucleótidos de uridina (P2U-R) (Choi et al. 2003b). La estimulación de estos receptores con ATP induce la proliferación celular posiblemente a través de la activación de las MAPK p42 y p44, y ERK, a partir de la activación de la vía de PKC (Choi et al. 2003a; Choi et al. 2003b).

Como en los estudios *in vitro* de la carcinogénesis ovárica, varias líneas celulares neoplásicas fueron recientemente establecidas a partir del OSE. La transfección del antígeno T SV-40 mayor en las células del OSE inducen algunas líneas celulares inmortalizadas unas de las cuales muestran crecimiento independiente del anclaje y la formación de tumores en ratones atímicos. Estas líneas celulares pueden llevar a nuevas pistas en los estadios pre-neoplásicos y tempranos de los carcinomas ováricos. Para entender la patogénesis del cáncer ovárico epitelial, son requeridos estudios especialmente diseñados sobre el OSE y los cambios estructurales relacionados encontrados posteriores a la ovulación (Katabuchi y Okamura, 2003).

Otras de las líneas derivadas de carcinoma ovárico que ha sido evaluada es la denominada SKOV3, estas células han sido utilizadas en estudios comparativos con células del OSE (Choi et al. 2006; Ong et al. 2000). Uno de estos ejemplos es el trabajo de Choi y colaboradores (2006), donde mostraron que mediante la estimulación de gonadotropinas se induce la expresión diferencial del mRNA de la hormona liberadora de gonadotropinas de mamífero (GnRH), de la GnRHII (similar a la GnRH de gallina y se expresa en algunas estructuras como la hipófisis y los ovarios), y del receptor de la GnRH (GnRHR); en células del OSE, en células de líneas celulares derivadas de carcinomas (A2780, Bg1, CaOV3, OVCAR3 y SKOV3) y en células inmortalizadas derivadas del OSE (IOSE-80 e IOSE-80PC) (Choi et al. 2006).

Se ha descrito que las células SKOV3 son un excelente modelo *in vitro* para evaluar la resistencia a los estrógenos en el tratamiento del cáncer ovárico. En un estudio (Hua et al. 1995), se comparó la expresión del mRNA del receptor a estrógenos (ER) en células SKOV3 y en células T47D derivadas del cáncer de seno, y esta fue similar; sin embargo, el crecimiento de las células SKOV3 no mostró respuesta al estradiol (E2) y no fue inhibido por antiestrógenos. El ER en las células SKOV3 muestra una constante de asociación con E2 normal. Lo anterior sugiere que la resistencia a los estrógenos en estas células es el resultado de la expresión constitutiva de E2 y la pérdida de la regulación de genes moduladores del crecimiento más que un defecto en la activación de los ER por los estrógenos como un regulador transcripcional, este efecto puede estar modulado por los RP (Hua et al. 1995).

2.11-Marcadores epiteliales en células del OSE

El establecimiento de cultivos celulares había representado un gran problema en el estudio del OSE, ya que estas células forman sólo una pequeña parte del ovario y son difíciles de separar de otras células por medios enzimáticos o físicos. A partir de los años 80, se desarrollaron los primeros cultivos celulares del OSE en varias especies (Auersperg et al., 1984; Auersperg et al., 2001).

Las células del OSE expresan marcadores propios de otros tejidos epiteliales tales como, las queratinas 7, 8, 18 y 19, la mucina, la vimentina y la N-caderina. Gracias a la expresión de estos marcadores, ha sido posible la identificación del tejido bajo distintas técnicas (Wong et al. 1999). Las caderinas son una familia de moléculas dependientes de Ca^{2+} que regulan la adhesión célula a célula selectiva y que indirectamente influyen sobre la expresión de genes a través de su estrecha asociación con las cateninas. En el humano, el OSE, las células de la granulosa y el mesotelio extra-ovárico, están conectados por N-caderinas (Auersperg et al., 2001). Algunos marcadores moleculares han sido utilizados para identificar modificaciones estructurales en algunos tejidos como el caso del OSE, en donde se ha propuesto que algunas proteínas membranales pueden estar involucradas en la expresión de un fenotipo patológico. La glicoproteína CA125 se encuentra en la superficie celular y aunque su función no está muy bien definida, en el adulto se ha reconocido como un marcador de la diferenciación epitelial y neoplásica

(Auersperg et al. 2001; Wong et al. 1999). CA125 es expresada por varios tipos de epitelio como el del oviducto, los del endometrio y los endo-cervicales; el pericardio y el peritoneo en el primer y segundo trimestre en fetos humanos y en las mujeres adultas, pero no por el OSE normal, por lo que ha sido utilizada como un marcador en la progresión neoplásica (Wong et al. 1999; Wong y Leung 2007). La expresión de E-caderina en el OSE humano está limitado a regiones donde las células asumen formas columnares y han tomado un fenotipo de epitelio metaplásico. Dado que la co-expresión de E-caderina con N-caderina en el OSE es condicional, se ha propuesto como un marcador de propensión hacia la diferenciación aberrante metaplásica o neoplásica (Auersperg et al. 2001).

La identificación de estas y otras proteínas así como el entendimiento de sus relaciones funcionales puede sentar las bases para el diseño de tratamientos contra patologías asociadas a procesos de transformación maligna en este y otros tejidos. Los cánceres epiteliales de ovario representan una patología grave, recurrente y de consecuencias fatales. Están asociadas con una pobre prognosis principalmente debido a un diagnóstico tardío donde se adquiere quimio-resistencia. El microambiente de los tumores consiste en componentes vasculares o fibroblásticos, de células inflamatorias en la respuesta inmune y de su relación con la MEC, como se ha mostrado en diversos estudios en células epiteliales normales y transformadas, se sugiere que después de la transformación maligna ocurren cambios extremos sobre la habilidad de las células para interactuar con su MEC y otras células vecinas (Ahmed et al. 2002).

El interés en el entendimiento del papel de la adhesión y la comunicación con estructuras extracelulares, se ha dirigido al estudio de receptores membranales de la familia de las integrinas. Estas glicoproteínas transmembranales formadas de subunidades α y β , actúan en unión entre la MEC y moléculas del citoesqueleto (Ahmed et al., 2002). Se sabe que los receptores purinérgicos tienen una influencia sobre la regulación de la expresión funcional de moléculas de la MEC (Bagchi et al. 2005; Erb et al. 2005) lo que sugiere una participación reguladora de este sistema de comunicación en estas vías.

3. JUSTIFICACIÓN

Las alteraciones en la comunicación purinérgica pueden relacionarse con procesos de transformación neoplásica en varios tejidos y se sugiere que juegan un papel fundamental en la génesis y desarrollo de patologías derivadas de alteraciones en la maquinaria apoptótica y proliferativa (Fu et al., 2009; Li et al., 2007; Solini et al., 2007).

El estudio del sistema purinérgico ha sido limitado en el OSE, no obstante la prevalencia en la identificación de alteraciones en células con origen epitelial en la mayoría de los casos de carcinoma ovárico (Aoki et al. 2000; Feeley y Wells, 2001). El estudio de células en cultivo primario del OSE de ratón, y su contraparte en células de carcinoma ovárico humano (SKOV3), puede aportar información sobre los principios que conducen a este tejido a estadios patológicos. La limitación en el acceso a especímenes ováricos humanos, nos llevó a evaluar las características funcionales en células de cultivo primario de ratón, que fue complementado con la utilización de una línea celular inmortalizada derivada del OSE de ratón y que presenta un fenotipo epitelial (MM14.Ov).

Los datos farmacológicos existentes permiten explorar la expresión funcional de receptores purinérgicos involucrados con la activación de vías de señalización que determinan el destino celular, pues se ha demostrado que el UTP y el UDP activan selectivamente a P2Y2, P2Y4 y P2Y6 (Brunschweiler y Müller, 2006; Chang et al. 1995; Communi et al. 1996; Nicholas et al. 1996), en consecuencia esta activación conduce a la regulación de procesos y donde alteraciones en estos receptores pueden ser determinantes en la generación de estados patológicos en este tejido.

En nuestro laboratorio, se ha reconocido la participación de los RP P2Y2 y P2Y6 en la regulación de la proliferación y la diferenciación celular en células de la teca ovárica de ratón (Vázquez-Cuevas et al. 2010), sin embargo en el OSE, la respuesta y las implicaciones fisiológicas y/o patológicas de estos receptores en respuesta al ATP, a UTP y a UDP, han sido poco exploradas.

4. HIPÓTESIS

Las células del OSE y las células transformadas derivadas de este tejido expresan receptores sensibles a ATP, UTP y UDP.

Existen diferencias en la expresión funcional de los receptores purinérgicos entre las células del OSE normales y con transformación neoplásica.

5. OBJETIVOS

General

Caracterizar funcionalmente la respuesta a ATP, UTP y UDP en células del OSE normales y transformadas. Reconocer por medio del marcaje inmunofluorescente la presencia de los receptores P2Y2, P2Y4 y P2Y6 en estos tipos celulares.

Particulares

Caracterizar el aumento de Ca^{2+} intracelular inducido por el agonista endógeno de los receptores purinérgicos (ATP), de los receptores P2Y2 y P2Y4 (ATP/UTP) y/o del receptor P2Y6 (UDP) en células del OSE en cultivo primario, en células de la línea MM14.Ov y en células de la línea SKOV3.

Realizar el marcaje por inmunofluorescencia de los receptores P2Y2, P2Y4 y/o P2Y6 en células del OSE en cultivo primario, en células de la línea MM14.Ov y en células de la línea SKOV3.

Evaluar las posibles diferencias en la respuesta funcional de los receptores purinérgicos expresados en estos tipos celulares.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

El aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) está involucrado en diversos procesos intracelulares como la exocitosis (Katz y Miledi, 1970) o en la activación de diversas proteínas como la adenilato ciclasa (Hardie, 1996). Los RP logran sus efectos biológicos generando directa o indirectamente incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Lee et al. 2005). Las propiedades del Ca^{2+} y su papel como uno de los principales segundos mensajeros le confieren especial importancia en los procesos fisiológicos intracelulares. Por ejemplo, una proporción considerable de las respuestas provocadas por un aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ son evocadas a través de la vía de síntesis de fosfoinosítidos, que es una cascada ubicua de señalización acoplada a proteínas G, la cual resulta no sólo en la liberación de Ca^{2+} de los reservorios sensibles a IP_3 , sino también en el influjo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática (Putney, 1987; Putney et al. 2001). El incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es un excelente indicador de la activación celular y ha sido utilizado en diversos estudios (Künzli et al. 2006; Schultze-Mosgau et al. 2000; Vázquez-Cuevas et al. 2011).

Evaluamos por medio de los incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, la respuesta celular producto de la activación purinérgica. En este estudio monitoreamos la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por medio de técnicas de fluorescencia funcional, a partir de la aplicación en el medio extracelular los diferentes agonistas sobre los tres tipos celulares evaluados.

Además, realizamos marcajes por medio de inmunocitoquímica para el reconocimiento de los receptores purinérgicos P2Y2, P2Y4 y P2Y6 en los tres tipos celulares, con la finalidad de identificar su expresión y conocer la localización sub-celular de dichos receptores.

6.1- Cultivo primario de células del epitelio superficial ovárico

Los cultivos primarios de células del OSE se realizaron a partir de ratonas de la cepa C-57 de 5-6 semanas de edad. Las ratonas en la fase de pro-estro del ciclo estral, fueron sacrificadas por dislocación cervical (técnica de sacrificio en animales de laboratorio aprobada por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología, UNAM).

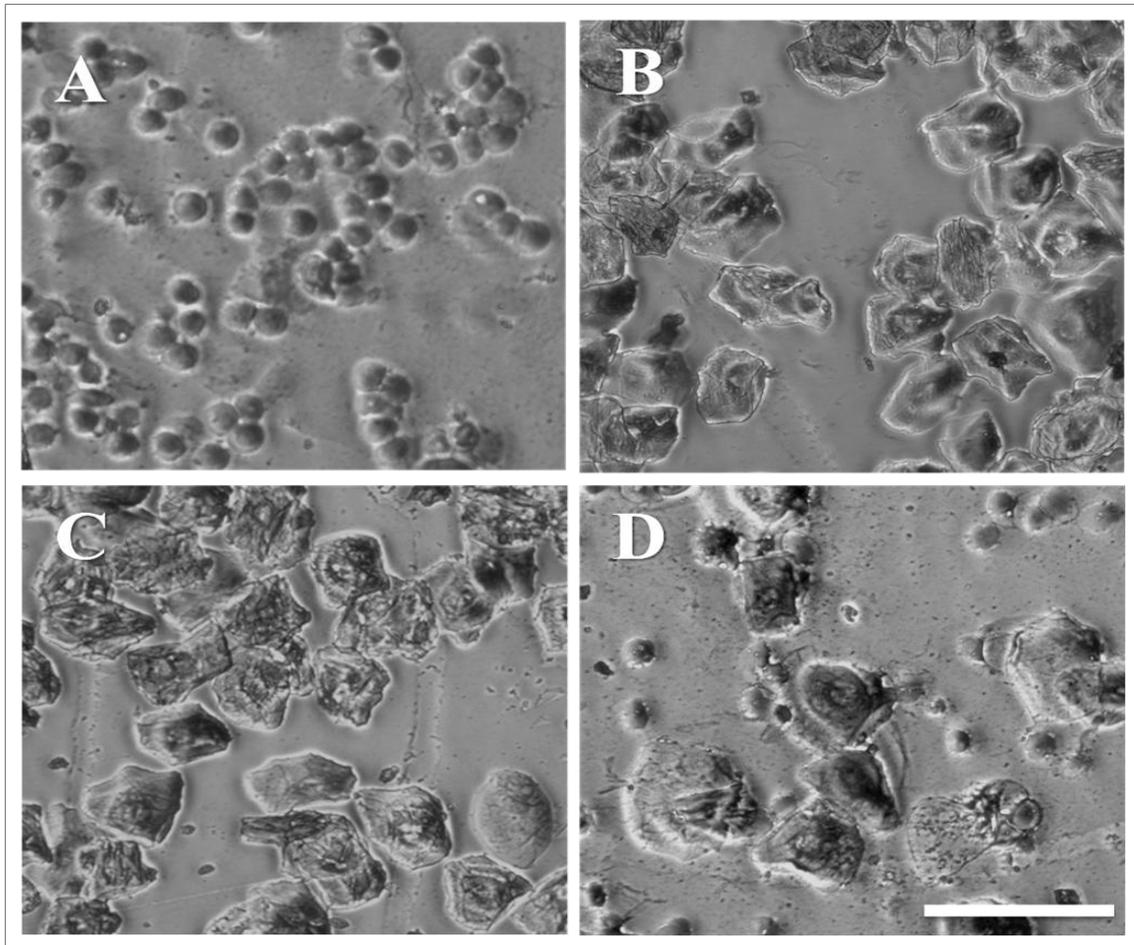


Figura 2. Frotis vaginal de ratona. Determinación del ciclo estral. A) Diestro: leucocitos y ausencia de células epiteliales; B) pro-estro: células epiteliales nucleadas y casi ausencia de leucocitos; C) estro: células epiteliales cornificadas, ausencia de leucocitos y D) meta-estro: disminución en células epiteliales cornificadas y presencia de leucocitos. Tinción con hematoxilina para los núcleos celulares y eosina para el citoplasma (barra= 20 μ m).

La disección de los ovarios, fue controlada y estandarizada en relación con el ciclo estral de las ratonas. Se realizó una prueba citológica por medio de frotis vaginal para obtener células sólo a partir de animales en pro-estro. La finalidad de esta determinación fue eliminar variables sobre la carga hormonal diferencial correspondiente a cada estadio del ciclo y su posible influencia sobre la actividad celular. El ciclo estral influye sobre la expresión de distintos receptores debido a la carga hormonal por lo que la utilización de células en una sola fase del ciclo permitió eliminar posibles variaciones.

En la figura 2 se muestran microfotografías en contraste de fase de los distintos estadios del ciclo estral del ratón, los cuales fueron reconocidos por el método de Stockard y

Papanicolaou (1917) realizado en el cuyo y que fue estandarizado en estos roedores posteriormente por Parkes (1928) a partir del trabajo de Allen (1922).

Los ovarios fueron disecados y colocados en medio de cultivo L-15, una vez eliminados los excedentes de tejido adiposo que rodea los ovarios, estos fueron descubiertos hasta mostrar la capa de células del OSE. Las células del OSE fueron entonces aisladas de los ovarios por digestión enzimática en colagenasa (4 mg/ml), en medio 199 por 18 minutos a 37°C; posterior a esto, se detuvo la reacción con medio DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12* Gibco, Invitrogen Co Grand Island NY) 1:1, complementado con 10% de suero fetal de bovino y antibiótico-antimicótico (Gibco, Invitrogen Co; Carlsbad CA). Se hizo pasar los ovarios repetidamente a través de la punta recortada de una pipeta para desprender células de la superficie. Esta técnica ha sido desarrollada, estandarizada y verificada en nuestro laboratorio, donde más del 90% de las células son positivas a queratina (marcador epitelial) (Troma-1, The Jackson Laboratory, Bar Harbor) (Vázquez-Cuevas et al. 2011) (figura 3).

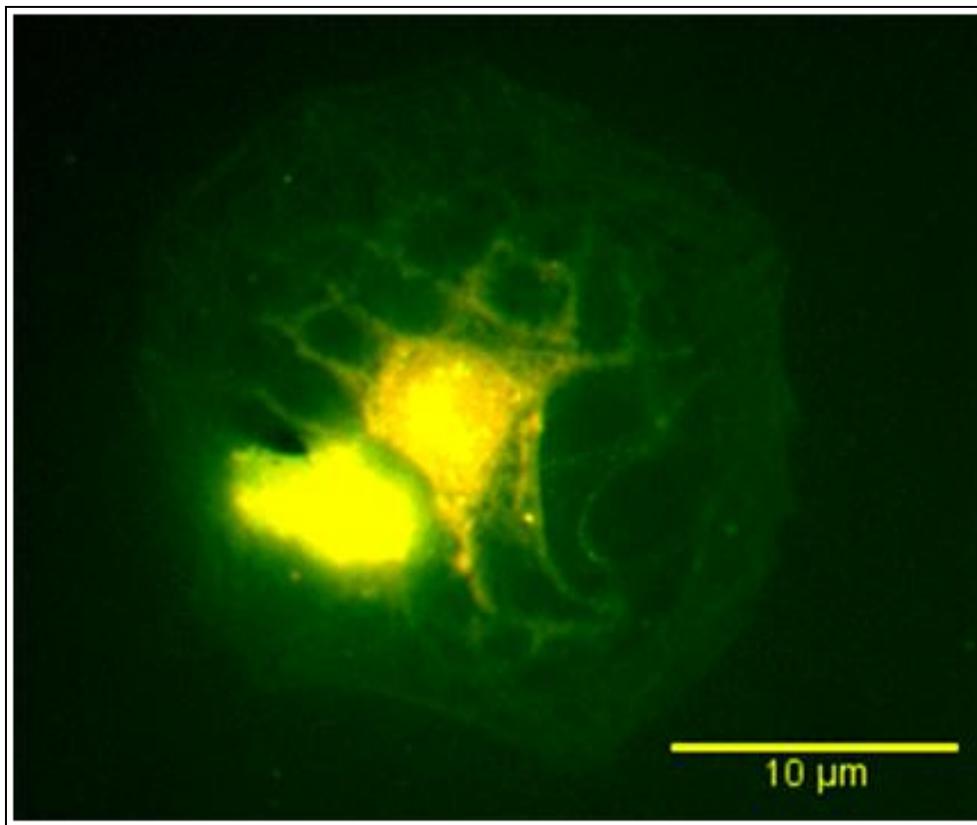


Figura 3. Marcaje por medio de inmuno-fluorescencia.

Anticuerpo contra queratina en las células obtenidas de cultivo primario del OSE de ratón (anticuerpo secundario acoplado al marcador fluorescente Alexa 488™ en verde, núcleo teñido con yoduro de propidio en rojo) (barra = 10 μm.

Posterior a la digestión enzimática y al desprendimiento mecánico de las células del OSE, estas fueron colectadas por centrifugación a 1500 rpm durante 5 min y se re-suspendieron en medio DMEM/F12, para ser colocadas sobre cubreobjetos de vidrio estériles, dentro de cajas de Petri a 37°C en una atmósfera 95% aire y 5% CO₂. Las células del OSE secretan proteasas de serina y metaloproteinasas de matriz, en consecuencia con su alta plasticidad fenotípica y la cual responde a factores micro-ambientales (Kruk et al. 1994), estos factores pudieran expresarse varias horas después de ser disecadas y desprendidas de su matriz original en el ovario intacto. Por lo anterior realizamos la estandarización de los experimentos, en donde utilizamos células únicamente en 72 h posteriores a su disección. Lo anterior, fue realizado con la finalidad de controlar cada experimento, esto fue considerado para que las células del OSE pudieran estabilizarse posteriormente al estrés provocado por la disgregación enzimática y el manejo y montaje de las correspondientes preparaciones.

6.2 Líneas celulares derivadas del OSE

Uno de los objetivos del presente trabajo fue identificar posibles variaciones en la respuesta a la estimulación por los agonistas purinérgicos (ATP, UTP y UDP) entre células normales y transformadas, por lo que empleamos dos líneas celulares además de los cultivos primarios. La línea de células inmortalizadas MM14.Ov (ATCC; Manassas VA, USA) (figura 4B) es derivada del ovario murino normal (línea HRS/J) y muestra un fenotipo epitelial, estas células han sido utilizadas por varios grupos en estudios sobre la proliferación (Auersperg et al., 1999; Fazili et al., 1999).

Fue utilizada también la línea celular SKOV3 (HTB-77™; ATCC, Manassas VA, USA) derivada de adenocarcinoma humano, la cual también presenta un fenotipo epitelial (figura 4C). Esta línea celular ha sido utilizada en varios estudios sobre las relaciones funcionales de elementos hormonales, receptores y factores microambientales que pudieran revelar patrones sobre la carcinogénesis (Hua et al. 1995, Choi et al. 2006).

El papel de los sistemas purinérgicos ha sido poco establecido en estas líneas celulares, a pesar de su probada participación en distintos mecanismos que subyacen la carcinogénesis en múltiples tejidos diferentes del ovario. Por lo anterior, consideramos

que el estudio en estos tres tipos celulares derivados del OSE es un modelo adecuado para el entendimiento de la fisiología y la fisiopatología ovárica. Las líneas celulares fueron cultivadas y mantenidas en medio DMEM complementado con 10% de SFB y antibiótico-antimicótico (Gibco, Invitrogen Co; Carlsbad CA). Estos cultivos fueron mantenidos entre 60 y 80 % de confluencia. Para esto, se realizaron pases de células para disminuir la confluencia y mantener una población de tamaño más o menos estándar.

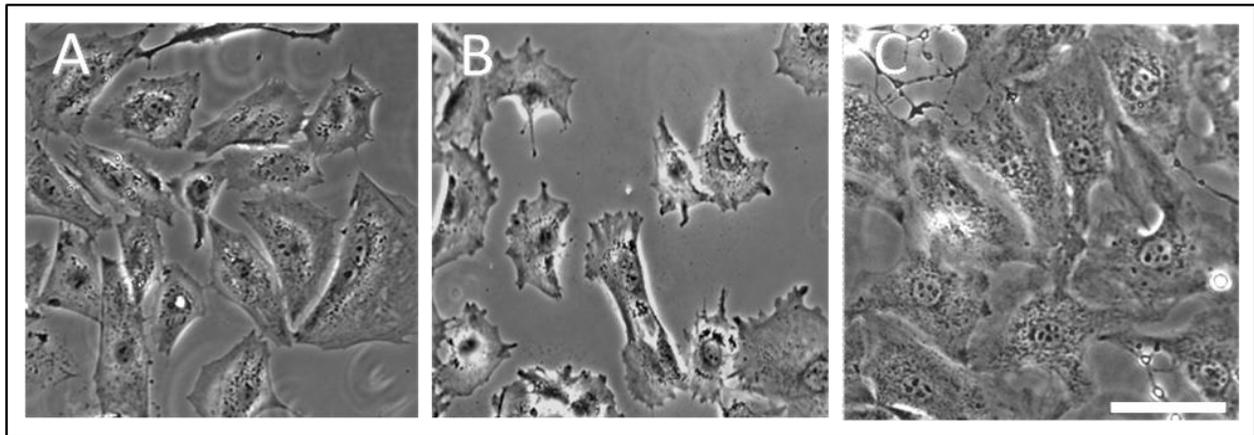


Figura 4. Preparaciones *in vitro* de (A) células de cultivo primario del epitelio superficial del ovario (OSE) de ratón, (B) células inmortalizadas derivadas del epitelio ovárico murino (MM14.Ov) y (C) células de carcinoma ovárico humano (SKOV3)(barra= 20 μ m).

Lo anterior se logró extrayendo el medio por aspiración, previo al lavado con solución de amortiguadora de fosfatos PBS (*Phosphates Buffer Solution*- composición en mM: NaCl 136, KCl 2.7, Na_2HPO_4 10 y KH_2PO_4 1.8). Por medio de este lavado, se eliminó el suero presente en el medio DMEM que inactiva o limita la acción enzimática. Las células fueron sometidas a digestión por tripsina 0.1% (Gibco, Invitrogen Co; Carlsbad CA) en medio DMEM sin suero a 37°C, 95% aire-5% CO_2 , durante 5 min. Luego se detuvo la reacción con la aplicación de DMEM conteniendo suero y las células se sembraron en nuevas cajas en proporción 1/10 del volumen de medio. Una vez que las células se adhirieron a las cajas el medio fue reemplazado para eliminar residuos celulares y la presencia de posibles trazas de tripsina.

El montaje de las células para el registro se realizó sobre cubreobjetos de vidrio lavados y esterilizados previamente. Las células, fueron colocadas en cajas de Petri con DMEM

y mantenidas por 48 h antes de los registros en la incubadora con el ambiente descrito con anterioridad. Lo anterior, con la finalidad de estabilizar a las células de posibles modificaciones por el tratamiento enzimático.

6.3-Cargado de las células con el marcador fluorescente de Ca^{2+} intracelular.

El monitoreo de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se realizó con la utilización del marcador fluorescente de Ca^{2+} Fluo-4 AM (Invitrogen, Molecular Probes; Carlsbad Ca, USA). Este fluoróforo de afinidad por el Ca^{2+} intracelular, está acoplado a un grupo acetoximetil éster (AM) que lo hace inactivo al mantenerlo „empaquetado“ en el medio extracelular, pero una vez en el citoplasma las esterasas intracelulares hidrolizan el grupo AM y el fluoróforo se acumula en el interior celular, quedando en su forma activa.

Las células a registrar fueron cargadas durante 20 min a 37°C en solución Krebs normal (composición en mM: NaCl 150, KCl 1, MgCl_2 1, CaCl_2 1.5, Hepes 10, glucosa 4 y BSA 0.05%), la cual fue adicionada con el Fluo-4 AM ($5 \mu\text{M}$). La difusión del fluoróforo al interior celular fue facilitada manteniendo la temperatura a 37°C y no fue necesario adicionar agentes surfactantes como en algunos estudios donde se ha reportado la utilización de ácido plurónico.

6.4 Registro de la actividad celular por microscopía

La solución de Krebs normal y las soluciones de Krebs conteniendo distintas concentraciones de los agonistas (10 nM-100 μM) fueron aplicadas utilizando un sistema de perfusión por gravedad, que permitió el intercambio de las mismas a una velocidad de $\sim 1\text{ml}/\text{min}$.

La cámara de perfusión estuvo montada sobre la platina de un microscopio invertido (Olympus IX71, Japan), objetivo 20X LCPlanFI TM y apertura numérica de 0.4. Este microscopio está equipado con un sistema de epifluorescencia que consiste en una fuente de iluminación por lámpara de mercurio Olympus TM BH2-RFL-T3 y un juego de espejos dicróicos que filtran la luz de excitación y emisión a longitudes de onda específica. Para el Fluo-4 AM, la luz fue filtrada a 488 nm, lo que permitió excitar la molécula fluorescente y coleccionar las señales luminosas de emisión en 516 nm

(fluorescencia) para ser captadas por una cámara de video monocromática de alta resolución.

6.5- Adquisición de imágenes

Las imágenes de fluorescencia fueron adquiridas por medio de la cámara de video (Evolution QEi *Monochrome*-cooled mono 12-bit, Media Cybernetics Canada) operada por el programa de cómputo ImagePro plus 4.5.0.19 (Media Cybernetics Inc. USA). Los parámetros para la adquisición de estas imágenes fueron los siguientes: duración del registro 99 s, 3 imágenes por segundo (FPS), con un tiempo de exposición de 150 ms. Las imágenes en formato TIF fueron guardadas como secuencias de 300 imágenes y observadas y analizadas como películas o filmes de la activación celular.

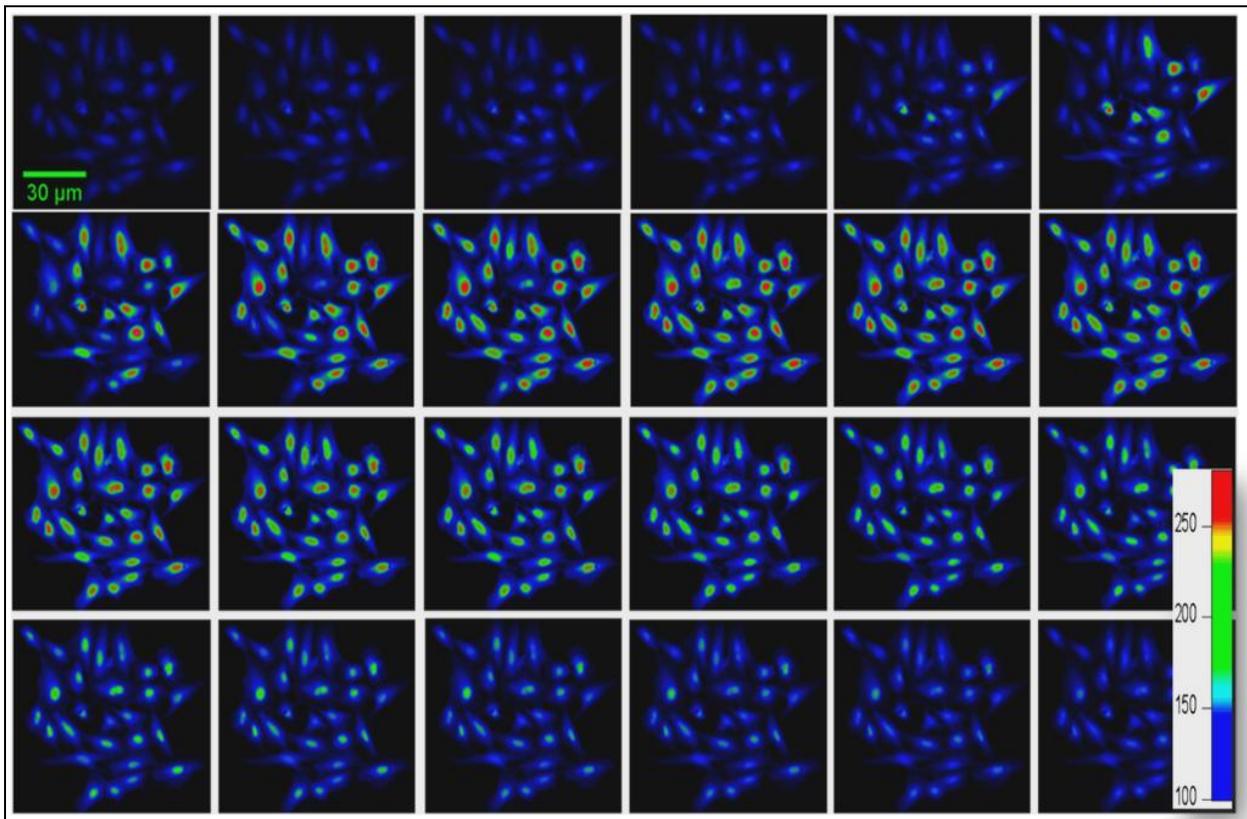


Figura 5. Secuencia de imágenes de la activación celular. Respuesta del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ por la inducción purinérgica en células MM14.Ov activadas por la aplicación de 100 μM de ATP. Las imágenes fueron adquiridas a 3 Hz pero son mostradas las imágenes en 0.33 Hz, la escala de pseudo-color de azul a rojo corresponde al porcentaje de fluorescencia respecto al 100% del basal (ΔF -).

6.6 Análisis de secuencias de imágenes

Para el análisis de las imágenes utilizamos el programa ImageJ 1.42q (National Institutes of Health, USA), en el cual por medio de su herramienta de selección de áreas permite identificar y marcar regiones de interés (ROI"s) correspondientes al área de cada célula analizada. Las variaciones en los índices de intensidad de fluorescencia sobre el basal (ΔF), fueron obtenidos a partir de los valores en una escala de grises de 16 bit y corresponden a las células con variaciones en la $[Ca^{2+}]_i$. Estos valores fueron calculados por el algoritmo del programa ImageJ, que asigna un valor numérico promedio en la escala indicada para cada ROI respecto al tiempo. Estos valores fueron normalizados y graficados como se muestra en los trazos representativos de la figura 6.

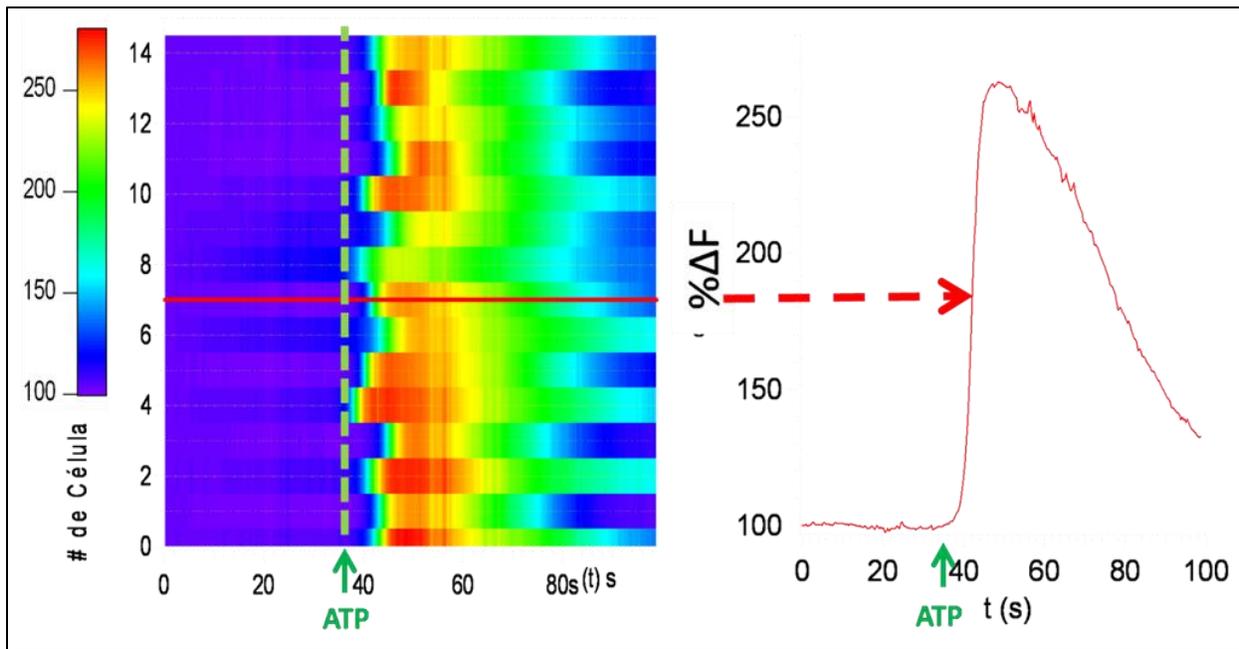


Figura 6. Mapa de la respuesta en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ por inducción purinérgica. En 15 células MM14.Ov (escala de color azul-rojo represente el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$; la línea roja corresponde a la célula de la cual se representa el trazo correspondiente a la aplicación de ATP 100 μ M; valores en porcentaje del incremento de la fluorescencia sobre el basal (% ΔF); 3 Hz, tiempo total del registro 99s).

Los valores obtenidos mediante este análisis reflejan la respuesta individual de las células en cada registro, que pueden ser evaluadas posteriormente de forma individual o colectiva para reconocer estadísticamente las respuestas características ante el estímulo

por un agonista específico. Los valores de las respuestas fueron normalizadas a fin de poder equiparar los valores de ΔF para áreas de células con distintos tamaños.

6.7 Inmunofluorescencia

Para detectar la expresión de la proteína y su localización sub-celular, realizamos el marcaje por anticuerpos para los receptores P2Y2, P2Y4 y P2Y6. Este marcaje se realizó utilizando a las células montadas sobre los vidrios como fue descrito en la sección anterior para cada uno de los tipos celulares. Se ha realizado la evaluación inmunológica de receptores P2Y en otros tejidos (Sage et al. 2002).

Después de que las células se mantuvieron en la incubadora en las condiciones mencionadas durante 48h, fueron lavadas con medio PBS y posteriormente se fijaron en acetona en frío por alrededor de 8 min. Realizamos 3 lavados con PBS por 5 min y bloqueamos por hora y media con leche 5% (Bio-Rad, Hercules CA) en solución PBS-Tween (composición PBS adicionado con Polioxietileno -20- sorbitan monolaurato 0.1%) (Tween® 20, Sigma-Aldrich Co. St. Louis MO). Después del bloqueo realizamos un lavado con PBS-Tween y aplicamos el anticuerpo primario (1/100) correspondiente a cada uno de los receptores mencionados (P2Y2, Chemicon-Millipore, Billerica MA; P2Y4 APR-006 y P2Y6 APR-011, Alomone Labs, Jerusalem, Israel).

Mantuvimos en refrigeración a 4°C por 24 h para posteriormente retirar el anticuerpo primario y realizar 3 lavados con PBS-Tween. Añadimos el anticuerpo secundario (marcador con fluoróforo Alexa 488™, longitud de onda para excitación = 488 nm. Longitud de onda de emisión = 516 nm) durante 2 h a temperatura ambiente. A partir de entonces las muestras se mantuvieron en oscuridad para evitar el foto-blanqueo. Se realizó un lavado del anticuerpo secundario con PBS-Tween y un segundo lavado con PBS-Tween adicionado con RNAsa A (Invitrogen, Carlsbad CA) y yoduro de propidio (Invitrogen Molecular Probes, Eugene Oregon 535/617 nm, longitudes de onda excitación/emisión) (1/1000 cada uno), se mantuvieron las muestras a temperatura ambiente por 20 min, se realizó un último lavado con PBS-Tween previo a ser fijadas en VectaShield™ (Vector Laboratories Inc. Burlingame CA) en portaobjetos sellados con barniz.

Posterior a esto, fue posible observar las muestras y adquirir fotografías a través del microscopio por fluorescencia utilizando un objetivo 60X de inmersión en aceite, y donde se utilizaron dos filtros dicróicos, uno para la señal del fluoróforo con el marcaje del anticuerpo y otro filtro para el yoduro de propidio, que fue utilizado para marcar los núcleos celulares. Se realizó posteriormente la composición de las imágenes por medio del programa ImagePro, y éstas fueron guardadas en formato TIF en una resolución de 500 x 500 píxeles.

6.8 Diseño experimental

La actividad celular puede ser evaluada bajo distintas metodologías con la finalidad de reconocer eventos eléctricos, la difusión iónica, o el intercambio e interacción entre proteínas; por ejemplo. Dentro de estas, la dinámica de Ca^{2+} puede ser medida para registrar la actividad celular, sin embargo, como todos los métodos establecidos en la actualidad esta metodología, presenta ciertas deficiencias y limitaciones. Dentro de estas limitantes destaca la resolución temporal en relación con otro tipo de registros como los electrofisiológicos, no obstante, esta resolución es suficiente para evaluar la actividad funcional de procesos celulares relacionados con la movilización de Ca^{2+} como lo es la activación purinérgica a través de receptores acoplados a proteínas G por lo que el método utilizado en el presente trabajo, se considera adecuado para evaluar este tipo de actividad.

Por medio de la movilización de Ca^{2+} intracelular se ha identificado y caracterizado la presencia funcional de receptores purinérgicos como el P2Y2 mostrado en estudios en células de carcinoma ovárico humano (Schultze-Mosgau et al. 2000). Las diferencias reconocidas en la forma en que el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se presenta, puede corresponder a múltiples factores como la activación conjunta de diferentes GPCR, o en consecuencia de la activación de canales iónicos de Ca^{2+} que generan incrementos transitorios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Esta dinámica de Ca^{2+} se presenta en múltiples mecanismos celulares y su regulación puede obedecer a eventos específicos por ejemplo: el influjo de iones de Ca^{2+} en el control de la proliferación y que puede actuar como un mitógeno general, las concentraciones de Ca^{2+} en la regulación del crecimiento celular que además son requeridas para soportar la proliferación en células normales y que se ha

observado es mucho mayor que la requerida por las células cancerosas, o alteraciones en los flujos de Ca^{2+} por promotores tumorales a través de mecanismos utilizados principalmente por factores de crecimiento (Durham y Walton, 1982).

Como puede observarse, la dinámica de Ca^{2+} aporta evidencias clave sobre la fisiología celular en diversos sistemas y el purinérgico no es la excepción; ya que distintos patrones pueden reflejar estadios fisiopatológicos específicos.

El aumento de Ca^{2+} intracelular provocado por el ATP es llevado a cabo a través de dos mecanismos principales: por medio de su influjo a través de la activación de los receptores P2X y por la acción de los receptores P2Y que puede tener un componente intracelular y otro extracelular. Es posible identificar la presencia de uno u otro tipo de receptor por distintos métodos como es el empleo de quelantes de Ca^{2+} intracelular, para eliminar el componente intracelular del incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Algunas de las respuestas provocadas por ATP pueden reflejar la activación de receptores P2X, que se sabe son también expresados en estas células (North 2002; North y Surprenant 2000; Vázquez-Cuevas et al. 2011).

La ambigüedad en el reconocimiento de las señales de Ca^{2+} generadas extra o intracelularmente pudo salvarse en gran medida debido a que el incremento de Ca^{2+} a través de canales iónicos membranales sucede en periodos de tiempo en el orden de milisegundos lo cual es imperceptible para nuestro sistema de adquisición, no así las señales de Ca^{2+} provenientes de los reservorios intracelulares, las cuales son señales relativamente más lentas en el orden de centenas de milisegundos hasta varios segundos.

Estas diferencias fueron superadas por nuestro sistema de adquisición, el cual cuenta con una resolución con ventanas de tiempo adecuadas para el tipo de activación evaluada; además, la aplicación de UTP y UDP limita en gran medida la participación de los receptores P2X pues estos receptores son inocuos o poco sensibles a dichos agonistas. El UTP es un agonista que activa potentemente a los receptores P2Y2 y P2Y4 y no así receptores P2X por lo que es de gran utilidad para discernir entre la presencia de estas dos subclases de RP. Utilizamos también UDP el cual es un agonista

que de manera preferencial actúa a través de los receptores P2Y6, en menor medida sobre los receptores P2Y4, y sin efecto alguno sobre los receptores P2Y2. Sin embargo, la selectividad de distintos agonistas como el UTP, no es del todo „limpia“ ya que puede activar con menor potencia a otro tipo de receptores.

Además de la información funcional de los receptores evaluada a partir de la movilización de Ca^{2+} por activación purinérgica selectiva, incluimos el marcaje de las proteínas formadoras de los receptores purinérgicos P2Y2, P2Y4 y P2Y6, en donde fue posible reconocer su distribución espacial, así como la densidad relativa de las señales inmunofluorescentes.

Una vez realizados los registros correspondientes, calculamos la EC_{50} para cada agonista en cada tipo celular por el método de regresión no lineal para curvas concentración-respuesta de pendiente variable por medio del programa GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego California USA, 2007) y cuyo algoritmo es el siguiente:

$$Y = \text{valor basal} + (\text{valor máximo} - \text{valor basal}) / (1 + 10^{(\text{Log}EC_{50} - X) * \text{pendiente de Hill}})$$

donde Y es el valor de la respuesta en % sobre el basal, X es el valor del logaritmo de la concentración molar del agonista, y la pendiente de Hill o número de Hill corresponde al valor de la pendiente en cada curva y que refleja la velocidad de incremento en la respuesta desde concentraciones bajas a mayores, y que puede corresponder a pocos elementos de interacción (mayor selectividad del agonista) cuando está pendiente es mayor; o puede corresponder a mayor número de elementos de interacción con el agonista (poblaciones) cuando este valor es menor.

La movilización de Ca^{2+} requerida para una respuesta celular sostenida puede ser producto de la activación de distintos receptores que interactúan con el agonista a diferentes órdenes de magnitud de concentración y que ha sido observada en un amplio espectro de procesos fisiológicos (Mikoshiba y Hattori, 2000; Penner et al. 1993; Putney, 2010; Salido et al. 2009a; Spassova et al. 2004). Por lo anterior en la evaluación de las señales de Ca^{2+} consideramos parámetros como la pendiente de Hill donde se refleja la velocidad en que se ocupan los receptores por la aplicación del agonista, el grado de

cooperatividad, o el reclutamiento de diferentes elementos en las cascadas de señalización. Esto puede reflejar diferencias entre posibles poblaciones de receptores responsivos.

Al evaluar los resultados derivados de la activación por los tres agonistas en las células SKOV3, notamos que el trazo calculado por la ecuación anterior no ajustaba a lo esperado por el modelo. Por lo que la evaluación de la aplicación de los agonistas sobre estas células se realizó a partir de un modelo de regresión no lineal para una curva bifásica con la que se logra un ajuste más adecuado y que es generada a partir del siguiente algoritmo:

$$\text{Trazo total} = \text{Límite superior} - \text{límite inferior}$$

$$\text{Sección 1 (fase 1)} = \text{extensión total} * \text{fracc} / (1 + 10^{(\text{LogEC}_{501} - X)^{nH1}})$$

$$\text{Sección 2 (fase 2)} = \text{extensión total} * (1 - \text{fracc}) / (1 + 10^{(\text{LogEC}_{502} - X)^{nH2}})$$

$$Y = \text{límite inferior} + \text{fase inferior} + \text{fase superior}$$

donde Y corresponde al valor de la respuesta en % sobre el basal, sección 1 o fase inferior (EC_{501}) y sección 2 o fase superior (EC_{502}), X representa el valor del logaritmo de la concentración molar del agonista ($\log [\text{agonista}] \text{ M}$). En las curvas bifásicas, „inferior“ y „superior“ son las mesetas a los extremos de la curva que muestran un valor medio de la respuesta máxima de estimulación. nH1 y nH2 son los factores de cola o coeficiente de Hill en el que 1 es el valor para la estimulación y -1 para valores en una curva de inhibición. Los valores de la pendiente no son calculados por el programa en la curva bifásica, por lo que fueron asignados aproximadamente en consecuencia con los valores de la pendiente de Hill observados en las curvas concentración-respuesta para el agonista correspondiente en los otros dos tipos celulares y que ajustaron a curvas sigmoides monofásicas. La fracción es la proporción de la respuesta máxima debida a la fase más potente en este caso fue considerada con valor de 1.

Los valores de potencia, sensibilidad y afinidad fueron los parámetros evaluados en cada condición a fin de proponer la adecuada expresión del receptor en cuestión y que fue complementada con la información derivada del análisis del marcaje por inmunofluorescencia.

7. RESULTADOS

7.1 Respuestas inducidas por ATP, UTP o UDP en células del OSE

La aplicación de ATP a las células del cultivo primario del OSE, indujo un aumento transitorio en la $[Ca^{2+}]_i$ que alcanza su máximo aproximadamente a los 7 s y retorna lentamente con un curso exponencial hasta un nivel cercano al basal (figura 7A). Esta respuesta fue dependiente de la concentración del agonista con un valor EC_{50} de $4.9 \pm 1.5 \mu M$ y una respuesta máxima de $345 \pm 12 \%$ de fluorescencia sobre el basal (ΔF), el valor de la pendiente de Hill fue de 0.57, los intervalos de confianza para los valores de las concentraciones calculadas se estimaron con un 95 % de confianza y estos fueron de 2.8 a 8.4 μM en estas células (figura 7B).

La estimulación de este tipo celular con UTP indujo un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ que alcanza su máximo en 6.3 s y decae hasta valores cercanos a la basal de forma semejante a lo observado con el ATP (figura 7C), dicha respuesta fue también dependiente de la concentración del agonista. Los datos se ajustaron a una curva sigmoide en la que se calculó un valor de $EC_{50} = 9.2 \pm 2.5 \mu M$ dentro de un intervalo de confianza del 95% (5.9-14.2 μM) el valor de Hill fue de 0.84 (figura 7D). La respuesta máxima presentó un valor de $279 \pm 10 \Delta F$.

En estas células la respuesta inducida por UDP presentó un aumento máximo en aproximadamente 13 s y en general regresó a su basal de manera más lenta a lo observado con los previos agonistas (figura 7E). Existe una dependencia en la concentración donde calculamos una $EC_{50} = 0.34 \pm 0.06 \mu M$ (intervalo de confianza de 95% entre 0.24 y 0.48 μM), con un valor de Hill = 1.83 y un aumento máximo en la respuesta del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ de $216 \pm 4 \Delta F$ (figura 7F).

7.2-Respuestas inducidas por ATP, UTP o UDP en células MM14.Ov

En las células MM14.Ov el ATP produjo un incremento transitorio en la $[Ca^{2+}]_i$ que alcanza un valor máximo aproximadamente a los 7 s, este valor máximo fue de $277 \pm 4 \Delta F$ (figura 8A). El aumento transitorio retorna hacia el valor basal relativamente de forma más lenta que la disminución observada posterior a la aplicación de ATP sobre las

células del OSE. El valor calculado para la EC_{50} fue de $2.1 \pm 0.3 \mu\text{M}$, el intervalo de confianza para la EC_{50} estuvo comprendido entre 6.6 y $15.8 \mu\text{M}$. El valor de la pendiente de Hill para estas condiciones fue de 1.4 (figura 8B).

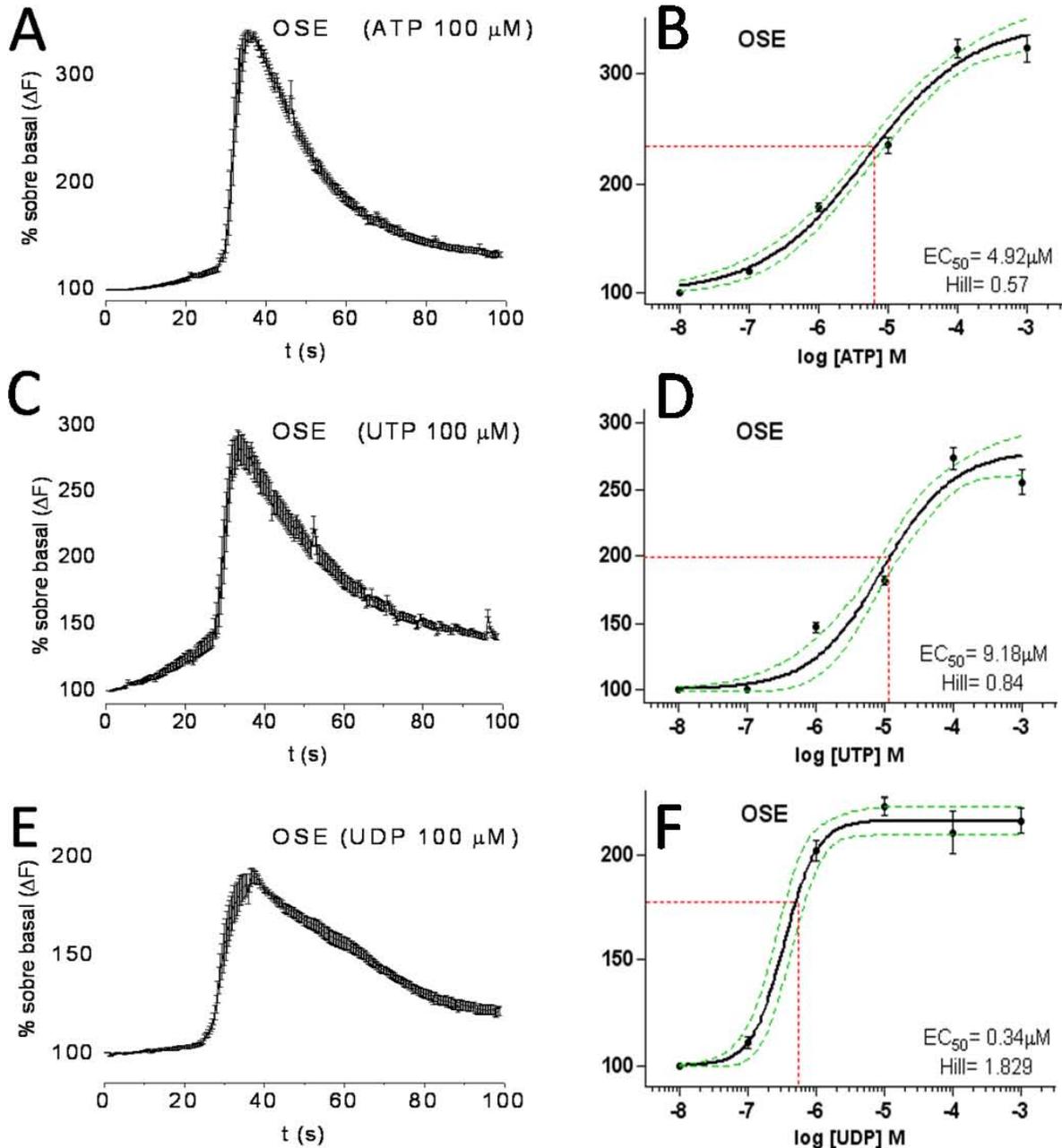


Figura 7. Respuestas a ATP, UTP o UDP en cultivos primarios de OSE de ratón. A, C y E. Trazo representativo de la respuesta a ATP, UTP o UDP (100 μM), para construir el trazo representativo se utilizó la media \pm e.e.m. de 10 células. **B, D y F.** Curvas concentración respuesta para ATP, UTP o UDP, las curvas se construyeron a partir de la respuesta media \pm e.e.m. de 50 células en al menos 4 experimentos independientes.

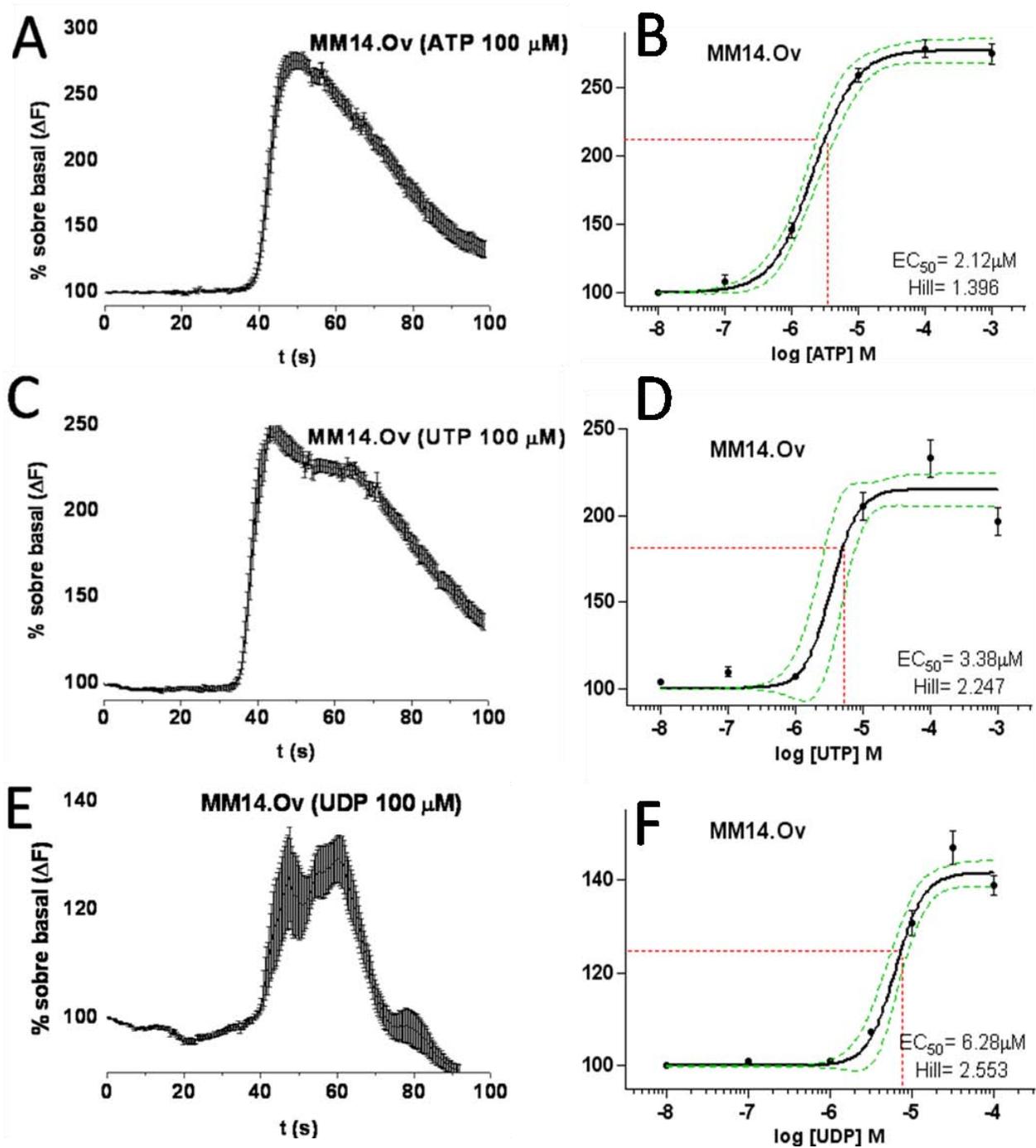


Figura 8. Respuestas a ATP, UTP o UDP en células MM14.Ov. A, C y E. Trazo representativo de la respuesta a ATP, UTP o UDP (100 μ M) (media \pm e.e.m. de 10 células). **B, D y F.** Curvas concentración respuesta para ATP, UTP o UDP, las curvas se construyeron a partir de la respuesta media \pm e.e.m. de 50 células en al menos 4 experimentos independientes.

En las células MM14.Ov observamos una respuesta inducida por UTP con un valor máximo de $215 \pm 5 \Delta F$, el cual se alcanzó a los 6 s. En este caso fue observado que se

produce una meseta durante el lavado de la respuesta posterior a la aplicación del UTP, pero que retorna a valores cercanos al basal (figura 8C). La EC_{50} calculada para este agonista fue de $3.4 \pm 1.2 \mu\text{M}$ dentro de un intervalo de confianza al 95% de 1.8 a $6.2 \mu\text{M}$. El valor de la pendiente de Hill por la aplicación de UTP sobre estas células fue de 2.24 (figura 8D).

Observamos una respuesta a UDP en las células MM14.Ov que alcanzó su valor máximo en 8 s. Este valor fue de $141.5 \pm 1.4 \Delta F$. El incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en este caso presentó un aumento paulatino y escaso lo que dificultó determinar el tiempo hasta el pico máximo; éste al alcanzar el valor máximo disminuye paulatinamente al valor basal en una fase posterior a la activación inicial (figura 8E). El valor EC_{50} en este caso fue de $6.3 \pm 0.8 \mu\text{M}$ dentro del intervalo de confianza comprendido entre 4.9 y $8 \mu\text{M}$. Calculamos un valor de la pendiente de Hill = 2.55 (figura 8F).

7.3 Respuestas inducidas por ATP, UTP o UDP en células SKOV3

La aplicación de ATP sobre células SKOV3 resultó en un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que alcanza un valor máximo de $231 \pm 4 \Delta f$ en aproximadamente 5 s y que retorna paulatinamente al basal pasando por una breve meseta de pocos segundos de duración (figura 9A). Al realizar el cálculo de la EC_{50} a partir de los valores observados se ajustan mejor a una curva sigmoide bifásica, lo que posiblemente pueda ser explicado por la expresión de dos poblaciones de receptores que se activan en concentraciones del agonista con diferencias en varios órdenes de magnitud.

A partir de los datos calculamos dos valores de la concentración media efectiva, EC_{501} y EC_{502} , que corresponden a valores de concentración en el orden nM y μM respectivamente $52.7 \pm 5.2 \text{ nM}$ y $14.1 \pm 4.8 \mu\text{M}$. Los valores de Hill para esta curva fueron de 3 y 1.6 para las fases baja y alta de la curva.

La respuesta inducida por UTP sobre las células SKOV3 provocó un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que alcanza un valor máximo a los 4 s. El valor máximo observado para esta respuesta fue de $287.5 \pm 7.2 \Delta F$ (figura 9C).

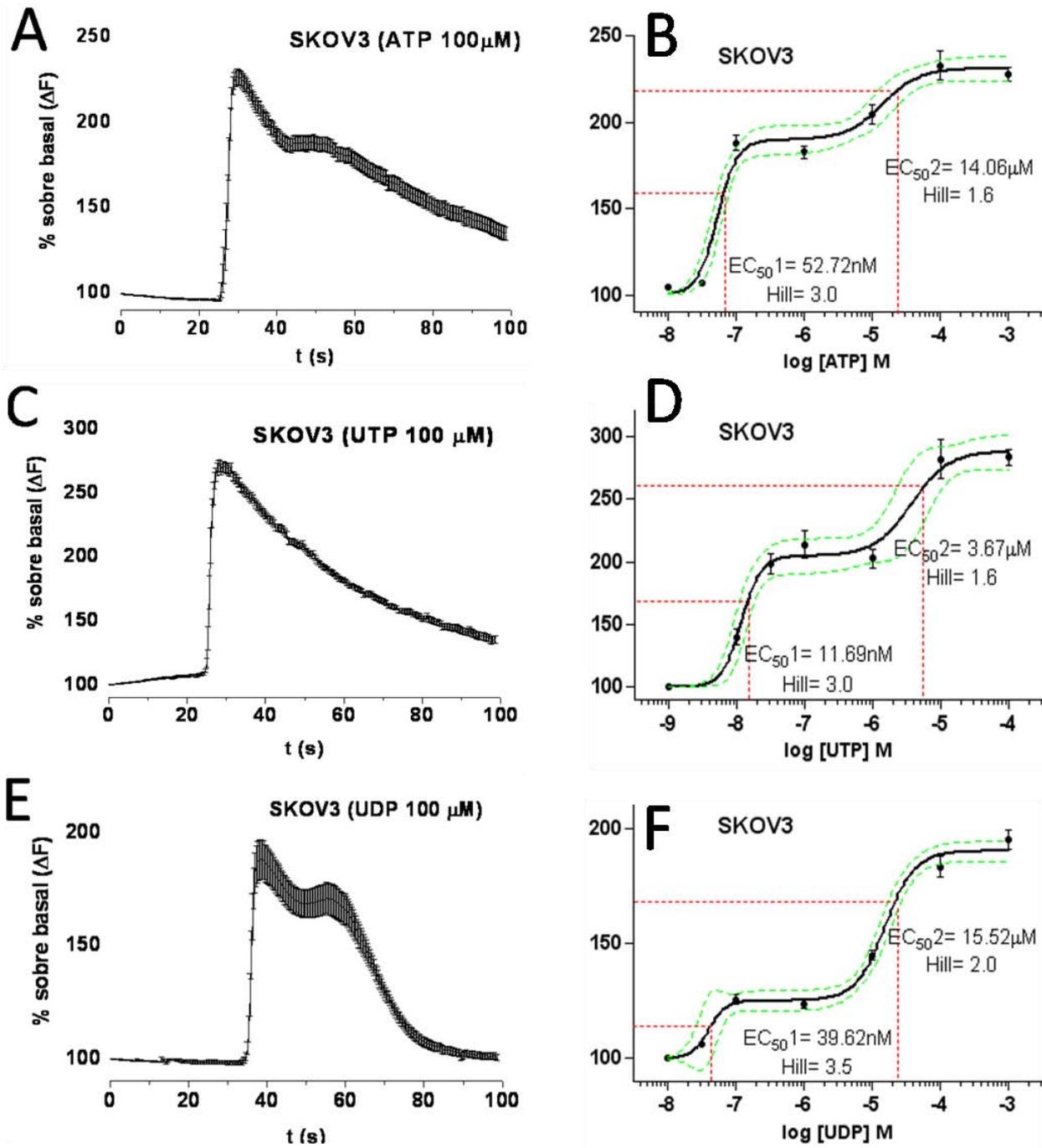


Figura 9. Respuestas a ATP, UTP o UDP en células SKOV3. **A, C y E.** Trazo representativo de la respuesta a ATP, UTP o UDP (100 μM) (media ± e.e.m. de 10 células). **B, D y F.** Curvas concentración respuesta para ATP, UTP o UDP, las curvas se construyeron a partir de la respuesta media ± e.e.m. de 50 células en al menos 4 experimentos independientes. Las respuestas por la aplicación de ATP y UTP ajustan a curvas C-R bifásicas con valores de EC₅₀ distintas en alrededor de 3 órdenes de magnitud (nM y μM) en ambos casos.

Los resultados se ajustaron a una curva sigmoide bifásica donde se estimaron los valores de 11.7 ± 1.8 nM para la EC_{501} y de 3.8 ± 2.8 μ M para la EC_{502} (figura 9D). Los valores de Hill para esta curva fueron para la fase inferior de 3 y para la fase superior de 1.6.

Por último, la aplicación de UDP sobre las células SKOV3 evocó una respuesta con valor máximo de 190.1 ± 2.1 ΔF alcanzada en 3s y que retorna al basal. Se observó nuevamente una respuesta que presentó una meseta en la disminución pero que posteriormente retornó de forma relativamente rápida (figura 9E). El valor de EC_{50} calculado correspondió nuevamente a una curva bifásica con valores de $EC_{501} = 39.6 \pm 1.7$ nM y para la $EC_{502} = 15.5 \pm 5.6$ μ M. Los valores de Hill en este caso fueron de 3.5 y 2 para la fase inferior y la superior respectivamente (figura 9F).

7.4-Detección de los receptores P2Y2, P2Y4 y P2Y6 por inmunofluorescencia

Realizamos el marcaje de los receptores P2Y2, P2Y4 y P2Y6 por medio de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos contra cada uno de ellos. Aunque este método de detección no es cuantitativo podemos sugerir que la intensidad con que se observan las señales puede ser baja o de poca densidad, y alta o de mayor densidad. En cada caso se realizaron controles donde únicamente se utilizó el marcador de los núcleos y el anticuerpo secundario, omitiendo el anticuerpo primario contra el receptor; la imagen del control es ilustrada en cada caso y corresponde a cada uno de los tipos celulares. Observamos que existe una distribución espacial relativamente distinta entre el marcaje para cada receptor entre los tipos celulares. En la serie de las siguientes figuras se muestran ejemplos en imágenes en pseudo-color, donde el color verde representa la marca del anticuerpo contra el receptor acoplado al fluoróforo Alexa 488™ y en rojo se ilustra el núcleo celular que fue marcado con yoduro de propidio.

Un ejemplo de la expresión de los receptores P2Y2 en los tres tipos celulares se muestra en la figura 10, donde la distribución de la proteína correspondiente al receptor es diferente entre los tres tipos celulares. En el OSE, el marcaje se observa en prácticamente todas las células y en cada una de ellas se presenta una distribución en forma de pequeños agregados dispersos por extensas regiones del citoplasma y

posiblemente en la membrana celular (N>100 células, en cada marcaje en al menos 4 preparaciones independientes provenientes de 3 animales).

La distribución de la marca fluorescente para el receptor P2Y2 en las células MM14.Ov fue bastante diferente respecto a los otros dos tipos celulares, ésta se observó también en prácticamente todas las células pero con una localización limitada a la proximidad del núcleo celular, su distribución estuvo restringida a regiones específicas del citoplasma y al parecer no se localiza en la membrana celular (N>100 células en cada marcaje de al menos 4 preparaciones en cada uno de 3 cultivos independientes).

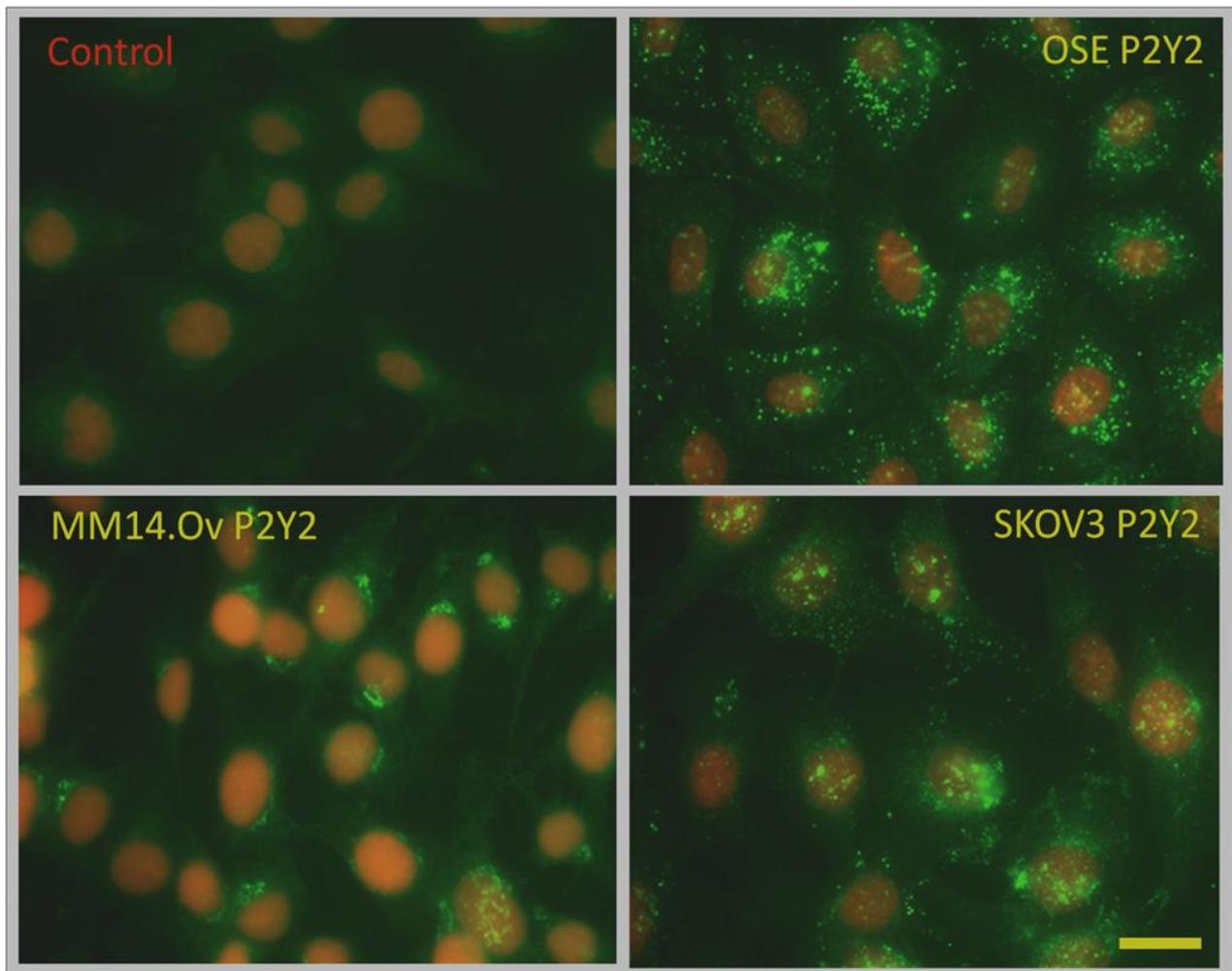


Figura 10. Marcaje por inmunofluorescencia de los receptores P2Y2 en células del OSE, MM14.Ov y SKOV3. En el control se omitió el anticuerpo primario (células MM14.Ov en este caso). Se utilizó un anticuerpo secundario acoplado a Alexa Fluor 488 (verde) y los núcleos celulares fueron teñidos con yoduro de propidio (rojo). (Barra=10 μ).

En las células SKOV3 el marcaje del receptor P2Y2 se presentó en la mayoría de ellas (>90 %), su distribución fue observada en pequeños agregados por gran parte del citosol y aparentemente en localización con la membrana celular. Esta distribución es similar a la observada en las células del OSE aunque con menor densidad (N>100 células en cada muestra de al menos 4 preparaciones, provenientes de 3 cultivos independientes).

7.5 Detección de los receptores P2Y4 por inmunofluorescencia

La detección por inmunofluorescencia del receptor P2Y4 permitió observar que prácticamente todas las células de los 3 tipos reconocen el marcador para este receptor. La inmunoreactividad se observó en una extensa distribución en las células del OSE y MM14.Ov y con menor densidad en las células SKOV3.

Para el receptor P2Y4 en el OSE, observamos señal inmunogénica en el 100% de las células analizadas (N>100 en 4 muestras a partir de cada uno de los cultivos independientes provenientes de 3 animales). La señal pudo detectarse dispersa por todo el citoplasma y posiblemente en la membrana celular, se presentó un patrón punteado con una distribución homogénea de gran densidad y pocos cúmulos o agregados.

El marcaje para el receptor P2Y4 en las células MM14.Ov fue muy similar al observado en las células OSE, de distribución homogénea en el citoplasma y posiblemente en la membrana celular; con algunos agregados o marcas de gran densidad en las inmediaciones del núcleo celular. Esta detección se realizó en el total de las células evaluadas (N>100 células, de al menos 4 preparaciones provenientes de 3 cultivos independientes).

La señal inmunodetectada en células SKOV3 para el receptor P2Y4 es también homogénea pero de menor densidad que la observada tanto en las células del OSE como en las células MM14.Ov. La señal se observó con mayor intensidad alrededor de los núcleos celulares. En el citoplasma y posiblemente en la membrana celular, se presentó una señal poco menos densa que en los otros dos tipos celulares. Esta señal fue detectada en prácticamente todas las células (N>100 células, de al menos 4 preparaciones provenientes de 3 cultivos independientes) (figura 11).

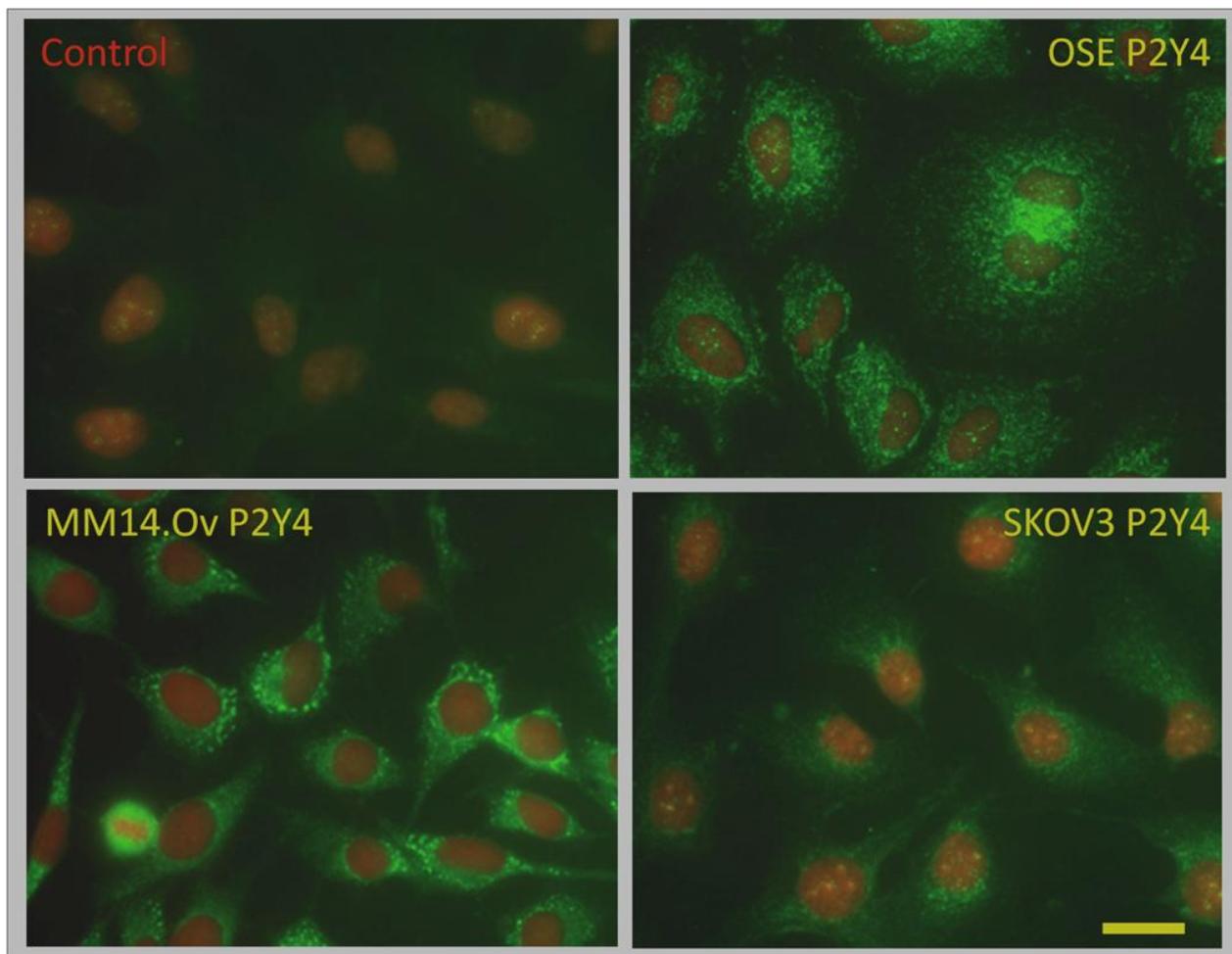


Figura 11. Marcaje por inmunofluorescencia de los receptores P2Y4 en células del OSE, MM14.Ov y SKOV3. En el control se omitió el anticuerpo primario (células SKOV3). Se utilizó un anticuerpo secundario acoplado a Alexa Fluor 488 (verde) y los núcleos celulares fueron teñidos con yoduro de propidio (rojo). (Barra=10 μ).

7.6 Detección de los receptores P2Y6 por inmunofluorescencia

Para el receptor P2Y6 el 100% de células del OSE presentó inmunoreactividad (N>100 células en al menos 4 muestras de preparaciones independientes en 3 animales), la señal se observó distribuida por toda la célula, con una mayor intensidad en la región perinuclear, la marca detectada para este receptor fue un poco más intensa en el OSE, respecto los otros dos tipos celulares.

El marcaje para el receptor P2Y6 fue reconocido en cerca del 100% de las células MM14.Ov (N>100 células, de al menos 4 preparaciones provenientes de 3 cultivos

independientes), en las que se observó una distribución del marcaje fluorescente por todo el citosol, esta señal es homogénea con una densidad menor que en las células del OSE y con una mayor intensidad en la región perinuclear.

En las células SKOV3 marcadas con el anticuerpo contra el receptor P2Y6 se observó en la mayoría de las células (> 80%) la marca fluorescente (N > 100 células evaluadas, en al menos 4 preparaciones provenientes de 3 cultivos independientes). La distribución de la señal es bastante limitada y se observa sólo en ciertas regiones en estrecha proximidad con el núcleo celular. Estas señales conforman pequeños agregados o pequeñas manchas poco difusas (figura 12).

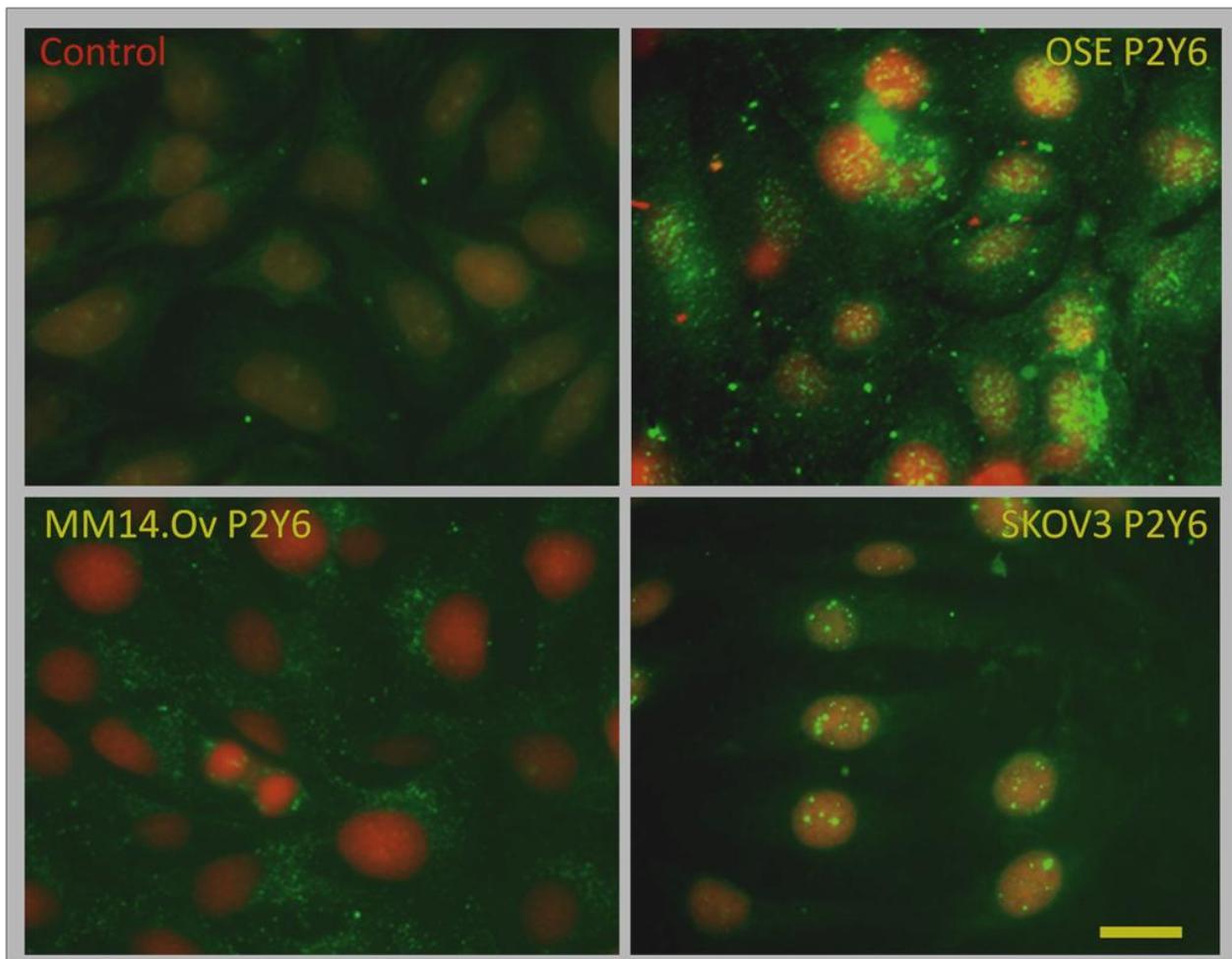


Figura 12. Marcaje por inmunofluorescencia de los receptores P2Y6 en células del OSE, MM14.Ov y SKOV3. En el control se omitió el anticuerpo primario (células OSE). Se utilizó un anticuerpo secundario acoplado a Alexa Fluor 488 (verde) y los núcleos celulares fueron teñidos con yoduro de propidio (rojo). (Barra=10 μ).

8. DISCUSIÓN

El objetivo fundamental del presente estudio fue explorar la expresión de los receptores P2Y2, P2Y4 y P2Y6 en células derivadas del epitelio ovárico de mamífero. Este grupo de receptores son de nuestro interés porque se ha demostrado que participan en una amplia variedad de procesos celulares de relevancia fisiológica en diferentes modelos celulares. Dado que la liberación de ATP por diferentes tipos celulares es común, este ATP que actúa de manera autócrina-parácrina puede constituir un mecanismo de autorregulación (Delic y Zimmermann, 2010; Duybak y El-Moatassim, 1993; Huwiler y Pfeilshifter, 1994). En varios modelos celulares se ha observado que el ATP liberado mantiene el tono de segundo mensajeros como el AMPc y el Ca^{2+} (Calvert et al. 2004; Corriden e Insel, 2010; Künzli et al 2006; Nylund et al. 2007). Esta idea ha sido poco explorada en modelos de cáncer, aunque existen aproximaciones en un modelo de cáncer de próstata (Slater et al., 1994), y podría representar un mecanismo de progresión tumoral al establecer un asa de retroalimentación positiva vía receptores P2Y, en adenocarcinoma ovárico humano este mecanismo no ha sido explorado. Un primer paso en el desarrollo de esta idea es caracterizar la expresión de receptores purinérgicos.

8.1 Dinámica de Ca^{2+}

La actividad celular puede ser evaluada reconociendo diversos procesos como la actividad eléctrica en neuronas; o el flujo iónico y el intercambio e interacción entre proteínas en virtualmente todas las células. Dentro de estas, las oscilaciones de Ca^{2+} pueden aportar información sobre distintos procesos celulares (transporte vesicular, exocitosis, activación de bombas iónicas dependientes de energía ATPasas de Ca^{2+} , entre otros) (Auersperg et al., 2001; Gendron et al. 2003; Hardie, 1996; Katz y Miledi, 1970).

Aquí hemos empleado el registro de la actividad de Ca^{2+} por fluorescencia, para evaluar la activación de los receptores purinérgicos P2Y2, 2Y4 y P2Y6. Estas señales de Ca^{2+} pueden corresponder principalmente a la activación de proteínas Gq acopladas a

receptores purinérgicos P2Y y la subsecuente liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares mediada por IP3 (Illes y Ribeiro, 2004; Mikoshiba y Hattori, 2000).

En algunas de las respuestas observamos señales que se mantuvieron por algún tiempo e incluso presentan fases sostenidas en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (figuras 8A, 8E, 9A, y 9C), que podrían corresponder al influjo de Ca^{2+} , inducido por la reducción de los niveles de Ca^{2+} en el lumen de los reservorios (frecuentemente referido como entrada de Ca^{2+} operada por reservorios o entrada capacitiva de Ca^{2+}) (Penner et al. 1993; Salido et al. 2009a; Salido et al 2009b).

De manera general las respuestas observadas alcanzaron el nivel máximo en algunos segundos, sin embargo mostraron algunas diferencias en la cinética de la disminución, por ejemplo: En las células del OSE o SKOV3 estimuladas con UTP (figura 7C y 9C) la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se observa una atenuación rápida y constante de la respuesta, mientras que en células MM14.Ov (figura 8C) la disminución de la respuesta presenta al menos 2 etapas, estas diferencias pueden reflejar mecanismos específicos en la función y desensibilización de cada receptor, sin embargo en el presente trabajo se utilizaron los valores máximos de las respuestas para definir que los receptores expresados son funcionales.

Para evaluar la respuesta purinérgica utilizamos ATP y los agonistas selectivos UTP (P2Y2 y P2Y4) y UDP (P2Y6). A partir de las respuestas en el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ calculamos los valores de EC_{50} para los agonistas mencionados en cada tipo celular y obtuvimos además los valores de la pendiente de Hill en cada caso.

8.2 Expresión de receptores purinérgicos por inmunofluorescencia

Aunada a la evaluación de la respuesta funcional de los RP, realizamos el marcaje inmunofluorescente de los receptores P2Y2, P2Y4 y P2Y6; lo que nos permitió proponer diferencias en la expresión funcional entre los modelos celulares evaluados. Los anticuerpos utilizados para la inmunofluorescencia han sido probados en diferentes estudios y se ha documentado ampliamente su especificidad (von Kügelgen y Harden, 2011). Los anticuerpos primarios utilizados reconocen a los receptores purinérgicos en la rata, ratón y humano, por lo que es equivalente su uso en células de estas tres especies.

Aunque no puede precisarse con exactitud la localización espacial de las proteínas componentes del complejo receptor, se pueden reconocer diferencias en su densidad, siendo posible generar una aproximación de la distribución espacial de los receptores respecto a estructuras como el núcleo (marcado con yoduro de propidio) y/o en el área correspondiente al citosol.

De manera general, detectamos la expresión de P2Y2, P2Y4 y P2Y6 en los 3 modelos celulares, pero con diferencias en la cantidad y en la localización. Los receptores P2Y2 se encuentran en una distribución similar entre las células del OSE y las células SKOV3, distribuyéndose en toda la célula con la presencia de "clusters" presumiblemente en dominios específicos de la membrana, en contraste en las células MM14-Ov detectamos cantidades pequeñas en la región perinuclear (figura 10). Por otro lado, la distribución aparente del receptor P2Y4 es generalizada y es la que se presenta con mayor homogeneidad entre los tres tipos celulares (figura 11); y por último la localización de menor similitud entre los tres tipos celulares es la del receptor P2Y6 en las células del OSE y MM14.Ov se observa en toda la célula, mientras que en las células SKOV3 hubo una localización perinuclear con muy baja abundancia (figura 12).

Estas observaciones sugieren que la respuesta a sus agonistas selectivos puede presentar claras diferencias reflejadas en el estudio funcional.

8.3 Respuestas purinérgicas en células del OSE

Reconocimos la respuesta de las células OSE al ATP y al UTP de manera casi equipotente (4.9 y 9.2 μM , respectivamente), lo que coincide con reportes previos sobre la activación de los receptores P2Y2 y P2Y4 (Bogdanov et al. 1998; Herold et al. 2004; Webb et al. 1998). Observamos similitud en el valor de la pendiente de Hill la cual se mantuvo por debajo de uno (0.53 y 0.84, respectivamente) lo que sugiere que para ambos agonistas existen diferentes poblaciones de receptores que responden ante dicho estímulo e incluso podría existir cooperatividad negativa. El ATP, además de activar receptores purinérgicos P2X, puede activar a los receptores P2Y2, P2Y4 y P2Y11 en el ratón; y el UTP es capaz de activar a los receptores P2Y2, P2Y4 y P2Y11 en esta misma especie, pero no así los receptores P2X.

El marcaje inmunofluorescente de los receptores P2Y2 y P2Y4 en estas células es evidente, aunque se observa una mayor densidad y una distribución más amplia del receptor P2Y4. Estos datos nos permiten sugerir que las respuestas a ATP o UTP pueden estar mediadas en gran parte por receptores P2Y2 y/o P2Y4 en este tipo celular murino y cuya activación coincide con los reportes farmacológicos previamente descritos.

En las células del OSE de ratón también identificamos respuestas a UDP dependientes de la concentración. El valor de la EC_{50} (0.34 μ M) y el valor de la pendiente de Hill para este agonista (1.8), sugieren que la respuesta a UDP está mediada por una población de receptores que puede corresponder al receptor P2Y6. El análisis por inmunofluorescencia además, evidenció una abundante expresión del receptor P2Y6, el subtipo más sensible a UDP (Abbracchio et al. 2010; Chang et al. 1995; Communi et al. 1996; Lazarowski et al. 2001; Li et al. 1998; Webb et al. 1998) reforzando la hipótesis de que la respuesta a UDP está mediada por este subtipo de receptores en las células del OSE.

8.4 Respuesta purinérgica en células MM14.Ov

Respecto a las células MM14.Ov, un modelo experimental de epitelio ovárico murino, nos preguntamos si la expresión funcional de receptores P2Y2, P2Y4 y P2Y6 es equivalente a la observada en células en cultivo primario.

Las células MM14.Ov respondieron al ATP de manera similar a las células del OSE mostrando un valor de $EC_{50} = 2.1 \mu$ M. El análisis de la respuesta a UTP generó un valor EC_{50} de 3.4 μ M (equipotente con la respuesta en el OSE) que puede corresponder a los receptores P2Y2 y/o P2Y4.

Por medio de inmunofluorescencia se observó una expresión abundante del receptor P2Y4 por toda la célula, y de P2Y2 en muy baja intensidad localizado en una región adyacente al núcleo, posiblemente fuera de su sitio de acción en la membrana celular. Dado que la pendiente de Hill parece corresponder a una sola población (valor de 1.4), cabe la posibilidad de que esta activación sea exclusivamente del receptor P2Y4. La distinta expresión del receptor P2Y2 observada por inmunofluorescencia entre las

células OSE y MM14.Ov salta a la vista, y dada su importancia fisiológica esta diferencia es fundamental.

Los datos obtenidos por microscopía funcional permitieron observar que la estimulación con UDP generó un valor EC_{50} de $6.3 \mu\text{M}$ que puede corresponder a receptores P2Y6; el marcaje de estos receptores por inmunofluorescencia permitió detectar su clara expresión, lo que corresponde con los datos farmacológicos. El valor de la pendiente de Hill para este caso es alto (2.6) por lo que este dato refuerza el supuesto de que tal respuesta corresponde exclusivamente a la activación de los receptores P2Y6.

Existen diferencias claras entre la expresión de los receptores purinérgicos evaluados en las células del OSE y las células MM14.Ov, por lo que esta línea celular no es un modelo adecuado de OSE.

8.5 Respuestas purinérgicas en células SKOV3

Las células SKOV3 son derivadas de un adenocarcinoma, nuestro interés radica en conocer las posibles diferencias entre los mecanismos purinérgicos entre las células derivadas de OSE normales y transformadas.

La principal diferencia observada entre las células SKOV3 y los otros dos tipos celulares es que éstas responden aparentemente a concentraciones de los 3 agonistas en distintos órdenes de magnitud. En el análisis realizado, las curvas concentración-respuesta calculadas, ajustaron de mejor forma a curvas bifásicas.

Para la respuesta a ATP también reconocimos una curva bifásica cuyos valores de $EC_{501} = 57.7 \text{ nM}$ y $EC_{502} = 14.1 \mu\text{M}$ (con diferencia de casi 3 órdenes de magnitud), e índices de la pendiente de Hill aproximados a 3 y por arriba de 1 respectivamente; sugieren que la respuesta en la fase inferior puede corresponder a una sola población o la existencia de cooperatividad, y en la fase alta posiblemente a la existencia de más de una población, pudiendo estar involucrados otros receptores P2Y y/o receptores P2X. En la respuesta a ATP puede estar participando el receptor P2Y2 pero no el receptor P2Y4 ya que el ATP funciona como antagonista competitivo sobre estos receptores en células

de humano (Abbracchio et al. 2010; Brunschweiler y Müller, 2006; Herold et al. 2004; Kennedy et al. 2000).

El incremento bifásico en la $[Ca^{2+}]_i$ ha sido observado en células de carcinoma ovárico OVCAR3, donde a concentraciones μM de ATP se promueve un incremento bifásico en la $[Ca^{2+}]_i$ con una fase rápida y una lenta pero sostenida (Popper y Batra, 1993). En aquel trabajo se observó que al quelar el Ca^{2+} con EGTA el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ fue monofásico y rápido; y que los bloqueadores de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje (VGCC), como la nifedipina y el verapamil, no tienen efecto sobre la acción del ATP, lo que puede reflejar la actividad de receptores P2X.

La respuesta a UTP en células SKOV3 muestra una bifase, lo que sugiere la presencia de dos poblaciones de receptores responsivas a UTP con órdenes de magnitud diferente; estos fueron $EC_{501}=11.7$ nM y $EC_{502}= 3.7$ μM . El valor propuesto para la pendiente de Hill (~ 3) sugiere que la fase de alta sensibilidad corresponde a la presencia de una población de receptores o la posibilidad de cooperatividad entre diferentes receptores. La respuesta de alta sensibilidad (EC_{501}) no se observó en los otros modelos celulares estudiados. Esta diferencia puede atribuirse a que la variante de humano del receptor P2Y4 es más sensible a UTP (Dubyak. 2003). Aunque esto pudiera atribuirse a diversos factores que pueden ser evaluados por métodos de análisis genético o de biología molecular, entre los que se encuentran; posibles mutaciones en residuos de amino ácidos de los receptores, la facilitación en la formación de los complejos diméricos en los que es activo el receptor, o con otro tipo de proteínas de interacción con el agonista/receptor.

El marcaje por inmunofluorescencia en este tipo celular permitió detectar la expresión de los receptores P2Y2 y P2Y4 que pueden responder a UTP y dado a que la curva en la fase de alta sensibilidad parece ser de una sola población, cabe la posibilidad de que ambos receptores estén respondiendo con una potencia similar o bien que presenten una interacción directa probablemente formando un heterodímero; pues en muchos sistemas es imposible diferenciar farmacológicamente a ambos receptores (Abbracchio et al. 2010; Charlton et al. 1996; von Kügelgen y Harden. 2011), sin embargo esta

hipótesis debe estudiarse a fondo, por ejemplo en experimentos de co-inmunoprecipitación.

El UDP en las células SKOV3 indujo una respuesta de movilización de Ca^{2+} con dos valores de $\text{EC}_{501} = 39.6 \text{ nM}$ y $\text{EC}_{502} = 15.5 \text{ } \mu\text{M}$, y que puede corresponder al receptor P2Y6. Estas respuestas son casi equipotentes a las respuestas inducidas por ATP y UTP en ambas fases, presentan valores de la pendiente de Hill altas (~ 3.5 y ~ 2) que pueden corresponder a una sola población de receptores para cada fase, y que pudieran ser debidas a la activación del receptor P2Y6. El marcaje por inmunofluorescencia muestra un nivel bajo en la expresión del receptor P2Y6, que sin embargo puede ser responsable de la respuesta a UDP.

Otras de las diferencias observadas en las respuestas purinérgicas entre estos tipos celulares fueron los valores máximos promedio para cada tipo celular, estos valores en respuesta a ATP fueron mayores en las células del OSE, $> \text{MM14.Ov} > \text{SKOV3}$, lo que sugiere que las células transformadas mantienen niveles relativamente bajos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a ATP. Existen diferencias también entre los valores máximos para cada tipo celular debidos a la aplicación de UTP, el valor de las respuestas máximas promedio es similar entre las células del OSE y las células SKOV3, lo cual pudiera tener una relación funcional sobre el mantenimiento de los niveles de Ca^{2+} en respuesta a UTP, y que son necesarios para la activación de vías de señalización involucradas en la proliferación y diferenciación celular mediada a través de los receptores P2Y2 y P2Y4 en estos tipos celulares, y que aparentemente se encuentran hiper-sensibilizados en las células SKOV3.

En resumen, esta es la primer demostración de la expresión funcional de receptores P2Y2, P2Y4 y P2Y6 en células del OSE de ratón, aunque su papel fisiológico no se conoce por completo.

Es indispensable realizar estudios más detallados que aporten evidencias sobre las señales y las moléculas involucradas en estos procesos tan complejos, como la participación hormonal, además de que sean controladas las condiciones microambientes que influyen en la homeostasis celular y en la comunicación cruzada

con el sistema purinérgico. Se requiere realizar estudios conjuntos sobre la activación de las cascadas de señalización involucradas en la activación purinérgica.

Los receptores purinérgicos P2Y2, P2Y4 y P2Y6 parecen presentar alteraciones con repercusiones funcionales en las células SKOV3 en relación con su contraparte en las células normales derivadas del OSE. lo que sugiere que el sistema purinérgico participa en carcinogénesis ovárica, y debe considerarse como un mecanismo fundamental en la fisiología y patología ovárica. La importancia de este sistema de comunicación en la clínica es potencialmente relevante tanto en el diagnóstico como en el tratamiento del cáncer, sin embargo, hace falta realizar más estudios que ayuden a esclarecer el papel preciso de estos receptores.

9-CONCLUSIONES

- 1.- Las células normales y transformadas derivadas del OSE incluidas en este estudio expresan receptores purinérgicos P2Y2, P2Y4 y P2Y6.
- 2.- Existen diferencias en la expresión funcional de los receptores P2Y2, P2Y4 y P2Y6 entre las células del OSE, las células MM14.Ov y las células SKOV3.
- 3.- Las células del OSE de ratón expresan receptores funcionales P2Y2 y P2Y4 que responden a ATP y/o a UTP; y receptores funcionales P2Y6 que responden a UDP.
- 4.- Las células MM14.Ov derivadas del OSE de ratón expresan receptores funcionales P2Y4 que responden a ATP y/o a UTP; y receptores funcionales P2Y6 que responden a UDP y de manera marginal expresan receptores P2Y2.
- 5.- Las células SKOV3 derivadas de adenocarcinoma ovárico humano expresan receptores funcionales P2Y2 que responden a ATP y/o UTP; receptores funcionales P2Y4 que responden a UTP y receptores funcionales P2Y6 que responden a UDP.
- 6.- Las respuestas a los agonistas selectivos UTP y UDP detectadas en células SKOV3 presentaron dos valores EC50, esta complejidad puede ser atribuida a interacciones entre los receptores que las distinguen claramente de los otros modelos utilizados.
- 7.- Las células MM14.Ov presentan notables diferencias en la distribución y expresión funcional de los receptores P2Y2, y diferencias en la expresión funcional de los receptores P2Y4 y P2Y6 respecto a las células del OSE; por lo que no pueden considerarse un buen modelo del OSE.

REFERENCIAS

- Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems J, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson K, Weisman G. 2006. International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein Nucleotide Receptors: From molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy. *Pharmacol Rev*, 58:281-34.
- Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H. 2009. Purinergic signalling in the nervous system an overview. *Trends Neurosci*, 32:19-29.
- Ahmed N, Maines-Bendiera S, Quinn MA, Unger WG., Dedhar S, Auersperg N. 2006. Molecular pathways regulating EGF-induced epithelial-mesenchymal transition in human ovarian surface epithelium. *Am J Physiol*, 290: C1532-C1542.
- Ahmed N, Riley C, Rice GE, Quinn M, Baker MS. 2002. $\alpha v \beta 6$ Integrin-A Marker for the Malignant potential of Epithelial Ovarian Cancer. *J Histochem Cytochem*, 50: 1371-1379.
- Ahmed N, Thompson EW, Quinn MA. 2007. Epithelial-mesenchymal interconversions in normal surface epithelium and ovarian carcinomas: an exception to the norm. *J Cell Physiol*, 213: 581-588.
- Aoki Y, Kawada N, Tanaka K. 2000. Early form of ovarian cancer originating in inclusion cysts: A case report. *J Reprod Med*, 45: 159-161.
- Aoyama R, Okada Y, Yokota S, Yasui Y, Fukuda K, Shinozaki Y, Yoshida H, Nakamura M, Chiba K, Yasui Y, Kato F, Toyama Y. 2011. Spatiotemporal and anatomical analyses of P2X receptor-mediated neuronal and glial processing of sensory signals in the rat dorsal horn. *Pain*, 152:2085-2097.
- Arellano RO, Garay E, Vázquez-Cuevas FG. 2009. Functional interaction between native G protein-coupled purinergic receptors in *Xenopus* follicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 16680-16685.
- 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.
- Auersperg N, Pan J, Grove BD, Peterson T, Fisher J, Maines-Bandiera S, Somasiri A, Roskelley CD. 1999. E-Cadherin induces mesenchymal-to-epithelial transition in human ovarian surface epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 6249-6254.
- Auersperg N, Siemens CH, Myrdal SE. 1984. Human ovarian surface epithelium in primary culture. *In Vitro*. 20:743-755.
- Auersperg N, Wong AS, Choi K, Kang SK, Leung PC. 2001. Ovarian Surface Epithelium: *Endocr Rev*, 22: 255-288.
- Azzi A, Boscoboinik D, Hensey C. 1992. The Protein Kinase Family. *Eur J Biochem*, 208: 547-557.
- Bagchi S, Liao Z, Gonzalez FA, Chorna NE, Seye CI, Weisman GA, Erb L. 2005. The P2Y2 nucleotide receptor interacts with αv integrins to activate Go and induce cell migration. *J Biol Chem*. 280:39050-39057.
- Bagnato A, Rosanò L. 2007. Epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer

- progression: a crucial role for the endothelin axis. *Cells Tissues Organs*, 185: 85-94.
- Balsinde J, Winstead MV, Dennis EA. 2002. Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett*, 531:2-6.
- Batra S, Fadeel I. 1994. Release of intracellular calcium and stimulation of cell growth by ATP and histamine in human ovarian cancer cells (SKOV-3). *Cancer Lett*, 28:57-63.
- Brännström M, Bonello N, Wang LJ, Norman RJ. 1995. Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) on ovulation in the rat ovary. *Reprod Fertil Dev*, 7:67-73.
- Blackburn MR. 2011. P2Y6 and vascular inflammation. *Blood*, 117:2304-2305.
- Block GJ, DiMattia GD, Prockop DJ. 2010. Stanniocalcin-1 Regulates Extracellular ATP-Induced Calcium Waves in Human Epithelial Cancer Cells by Stimulating ATP Release from Bystander Cells. *PLoS ONE* 20:e10237.
- Boeynaems JM, Communi D, Piroton S, Motte S, Parmentier M. 1996. Involvement of distinct receptors in the actions of extracellular uridine nucleotides. *Ciba Found Symp*, 198:266-274.
- Bogdanov YD, Wildman SS, Clements MP, King BF, Burnstock G. 1998. Molecular cloning and characterization of rat P2Y4 nucleotide receptor. *Br J Pharmacol*, 124:428-430.
- Boucher I, Rich C, Marcincin M, Trnkaus-Randall V. 2010. The P2Y2 receptor mediates the epithelial injury response and cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol*, 299:C411-421.
- Brinson AE, Harden TK. 2001. Differential regulation of the uridine nucleotide-activated P2Y4 and P2Y6 receptors: SER-333 and SER-334 in the carboxyl terminus are involved in agonist-dependent phosphorylation desensitization and internalization of the P2Y4 receptor. *J Biol Chem*, 276:11939-11948.
- Brown DA, Filippov AK, Barnard EA. 2000. Inhibition of potassium and calcium currents in neurons by molecularly-defined P2Y receptors. *J Auton Nerv Syst*, 81:31-36.
- Browne LE, Jiang L, North A. 2010. New structure enlivens interest in P2X receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 3: 229-237.
- Brunschweiler A, Müller CE. 2006. P2 receptors activated by uracil nucleotides –an update. *Curr Med Chem*, 13:289-312.
- Bucheimer RE, Linden J. 2003. Purinergic regulation of epithelial transport. *J Physiol*. 555:311-321.
- Burnstock G. 1972. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev*, 24: 509-581.
- Burnstock G. 1976. Purinergic receptors. *J Theor Biol*, 62: 491-503.
- Burnstock G. 2007. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev*, 87: 659-797.
- Burnstock G. 2009. Purinergic Signalling: past, present and future. *Braz J Med Biol Res*, 42: 3-8.
- Burnstock G, Williams M. 2000. P2 Purinergic Receptors: Modulation of Cell Function

and therapeutic Potential. *J Pharmacol Exp Ther*, 295: 862-869.

- Caler EV, Morty RE, Burleigh BA, Andrews NW. 2000. Dual role of signalling pathways leading to Ca^{2+} and cyclic AMP elevation in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*, 68: 6602-6610.
- Calvert JA, Atterbury-Thomas AE, Leon C, Forsythe ID, Gachet C, Evans RJ. 2004. Evidence for P2Y1, P2Y2, P2Y6 and atypical UTP-sensitive receptors coupled to rises in intracellular calcium in mouse cultured superior cervical ganglion neurons and glia. *Br J Pharmacol*, 143:525-532.
- Camden JM, Schrader AM, Camden RE, González FA, Erb L, Seye CI, and Weisman GA. 2005. P2Y2 nucleotide receptors enhance alpha-secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *J Biol Chem*, 280:18696–18702
- Casas-Pruneda G, Reyes JP, Pérez-Flores G, Pérez-Cornejo P, Arreola J. 2009. Functional interactions between P2X4 and P2x7 receptors from mouse salivary epithelia. *J Physiol*, 587: 2887-2901.
- Cavaliere F, Nestol V, Amadio S, D'Ambrosi N, Angelini DF, Sancesario G, Bernardi G, Volnte C. 2005. The metabotropic P2Y4 receptor participates in the commitment to differentiation and cell death of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurobiol Dis*, 18:100-109.
- Chang K, Hanaoka K, Kumada M, and Takuwa Y. 1995. Molecular cloning functional analysis of a novel P2 nucleotide receptor. *J Biol Chem*, 270:26152–26158.
- Charlton SJ, Brown CA, Weisman GA, Turner JT, Erb L, Boarder MR. 1996. Cloned and transfected P2Y4 receptors: characterization of suramin and PPADS-insensitive response to UTP. *Br J Pharmacol*. 119:1301-1303.
- Chen D, Wang W, Guop W, Yu Q, Burnstock G, He C, Xiang Z, Zheng H. 2011. Expression of P2Y6 receptors in the developing mouse skeletal muscle and after injury and repair. *J Anat*, 218:643-651.
- Cheung KK, Ryten M, Burnstock G. 2003. Abundant and dynamic expression of G protein-coupled P2Y receptors in mammalian development. *Dev Dyn*, 228:254–266.
- Choi K, Auersperg N, Leung PC. 2003. Mitogen-activated protein-kinases in normal and (pre) neoplastic ovarian surface epithelium. *Reprod Biol Endocrinol*, 1:71.
- Choi K, Tai C, Tzeng CR, Auersperg N, Leung PC. 2003. Adenosine Triphosphate Activates Mitogen-Activated Protein Kinase in Pre-Neoplastic and Neoplastic Ovarian Surface Epithelial Cells. *Biol Reprod*, 68: 309-315.
- Clark-Knowles KV, Senterman MK, Collins O, Vanderhyden BC. 2009. Conditional inactivation of Brca1, p53 and Rb in mouse ovaries results in the development of leiomyosarcoma. *PLoS ONE* 4: e8534.
- Clarke LL, Boucher RC. 1992. Chloride secretory response to extracellular ATP in human normal and cystic fibrosis nasal epithelia. *Am J Physiol*, 263:C348-C356.
- Clarke LL, Harline MC, Gawenis LR, Walker NM, Turner JT, Weisman GA. 2000. Extracellular UTP stimulates electrogenic bicarbonate secretion across CFTR

- knockout gallbladder epithelium. *Am J Physiol*, 279:G132-G138.
- 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.
- Communi D, Boeynaems JM. 1997. Receptors responsive to extracellular pyrimidine nucleotides. *TiPS*, 18:83-86.
- Communi D, Motte S, Boeynaems JM, Piroton S. 1996. Pharmacological characterization of the human P2Y4 receptor. *Eur J Pharmacol*, 317:383-389.
- Communi D, Paindavoine P, Place GA, Parmentier M, Boeynaems J-M. 1999. Expression of P2Y receptors in cell lines derived from the human lung. *Br J Pharmacol*, 127:562-568.
- Communi D, Piroton S, Parmentier M, Boeynaems JM. 1995. Cloning and functional expression of a human uridine nucleotide receptor. *J Biol Chem*, 270: 30849-30852.
- Coutinho-Silva R, Stahl L, Cheung KK, de Campos NE, de Oliveira Souza C, Ojcius DM, Burnstock G. 2005. P2X and P2Y purinergic receptor on human intestinal epithelial carcinoma cells: effects of extracellular nucleotides on apoptosis and cell proliferation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 288:G1024-G1035.
- Corriden R, Insel PA. 2010. Basal release of ATP: An Autocrine-Paracrine Mechanism for Cell Regulation. *Sci Signal*, 12:104-re1.
- Cressman VL, Lazarowski E, Homolya L, Boucher RC, Koller BH, Grubb BR. 1999. Effects of loss of P2Y2 receptor gene expression on nucleotide regulation of murine epithelial Cl(-) transport. *J Biol Chem*, 274:26461-26468.
- Deli T, Csernoch L. 2008. Extracellular ATP and Cancer-An Overview with Special Reference to P2 purinergic Receptors. *Pathol Oncol Res*, 14: 219-231.
- Delic J, Zimmermann H. 2010. Nucleotides affect neurogenesis and dopaminergic differentiation in mouse fetal midbrain-derived neural precursor cells. *Purinergic Signal*, 6:417-428.
- Deligdisch L, Einstein AJ, Guera D, Gil J. 1995. Ovarian dysplasia in epithelial inclusion cysts: A morphometric approach using neural networks. *Cancer*, 76: 1027-1034.
- Dixon CJ, Bowler WB, Fleetwood P, Ginty AF, Gallagher JA, Carron JA. 1997. Extracellular nucleotides stimulate proliferation in MCF-7 breast cancer cell via P2-purinoceptors. *Br J Cancer*, 75:34-39.
- Dobolyi A, Juhász G, Kovács Z, Kardos R. 2011. Uridine function in the central nervous system. *Curr Top Med Chem*, 11:1058-1067
- Dubyak G. 2003. Knock-Out mice reveal tissue-specific roles of P2Y receptor subtypes in different epithelia. *Mol Pharmacol*, 63:773-776.
- Dubyak GR., El-Moatassim C. 1993. Signal transduction via P₂-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *J Physiol*, 265:C577-C606.
- Durham AC, Walton JM. 1982. Calcium ions and the control of proliferation in normal and cancer cells. *Biosci Rep*, 2:15-30.

- EI-Tayeb A, Qi A, Müller CE. 2006. Synthesis and structure-activity relationship of uracil nucleotide derivatives and analogues as agonists at human P2Y₂, P2Y₄ and P2Y₆ receptors. *J Med Chem*, 49:7076-7087.
- Erlinge D, Burnstock G. 2008. P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic Signalling*, 4:1-20.
- Erb L, Liao Z, Seye CI, Weissman GA. 2006. P2 receptors: intracellular signaling. *Pfluger Arch*, 452:552-562.
- Erb L, Liu J, Ockerhausen J, Kong Q, Garrad RC, Griffin K, Neal C, Krugh B, Santiago-Pérez LI, González FA, Gresham HD, Turner JT, Weisman GA. 2001. An RGD sequence in the P2Y₂ receptor interacts with alpha(V)beta(3) integrins and is required for G(o)-mediated signal transduction. *J Cell Biol*, 153:491-501.
- Fazili Z, Sun W, Mittelstaedt S, Cohen C, Xu XX. 1999. Disabled-2 inactivation is an early step in ovarian tumorigenicity. *Oncogene*, 20:3104-3113.
- Feeley KM, Wells M. 2001. Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. *Histopathology*, 38: 87-95.
- Filippov AK, Webb TE, Barnard EA, Brown DA. 1997. Inhibition by heterologously-expressed P2Y₂ nucleotide receptors of N-type. *Br J Pharmacol*, 121:849-851.
- Filippov AK, Simon J, Barnard EA, Brown DA. 2003. Coupling of the nucleotide P2Y₄ receptor to neuronal ion channels. *Br J Pharmacol*, 138:400–406.
- Fredholm BB. 2010. Adenosine receptor as drug targets. *Exp Cell Res*, 316: 1284-1288.
- Fu W, McCormick T, Luo L, Zhou L., Wang BC., Gibbons HE., Abdul-Karim FW, Gorodeski GI, 2009, Activation of P2X₇-mediated apoptosis inhibits DMBA/TPA-induced formation of skin papillomas and cancer in mice. *BMC Cancer* 20; 9: 114.
- Gendron FP, Newbold NL, Vivas-Mejia PE, Wang M, Neary JT, Sun GY, Gonzalez FA, Weisman GA. 2003. Signal transduction pathways for P2Y₂ and P2X₇ nucleotide receptors that mediate the neuroinflammatory responses in astrocytes and microglial cells. *Biomed Res* 14:47-61.
- Gomperts BD, Kramer IM, Tatham PER. Effector enzymes coupled to GTP binding proteins: adenylyl cyclase and phospholipase C, Chapter 5, en *Signal Transduction 2nd ed.* Gomperts BD, Kramer IM, Tatham PER. Eds. Elsevier Inc. 2009. San Diego, CA. USA.
- Greig AV, Linge C, Cambrey A, Burnstock G. 2003 Purinergic receptors are part of a system for keratinocyte proliferation, differentiation, and apoptosis in human fetal epidermis. *J Invest Dermatol*, 121:1145-1149.
- Groschel-Stewart U, Bardini M, Robson T, Bursnstock G. 1999. Localization of P2X₅ and P2X₇ receptors by immunohistochemistry in rat stratified squamous epithelia. *Cellular Tissue Research*, 296:599-605.
- Guns PJ, Van Assche T, Fransen P, Robaye B, Boeynaems JM, Bult H. 2006. Endothelium-dependent relaxation evoked by ATP and UTP in the aorta of P2Y₂-deficient mice. *Br J Pharmacol*, 147:569-74.

- Hansen M. R., Krabbe S., Novak I. 2008. Purinergic receptors and calcium signalling in human pancreatic duct cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 22: 157-168.
- Hardie RC. 1996. Calcium signaling: Setting store by calcium channels. *Curr Biol*, 6:1371-1373.
- Hassenklöver T, Schulz P, Peters A, Schwartz P, Schild D, Manzini I. 2010. Purinergic receptor-mediated Ca^{2+} signaling in the olfactory bulb and neurogenic area of lateral ventricles. *Purinergic Signal*, 6:429-445.
- Häussinger D, Stehle T, Gerok W. 1987. Actions of extracellular UTP and ATP in perfused rat liver. A comparative study. *Eur J Biochem*, 167:65-71.
- Hepler PK. 1994. The role of calcium in cell division. *Cell Calcium*, 16:322-330.
- Herold CL, Qi AD, Harden TK, Nicholas RA. 2004. Agonist versus antagonist action of ATP at the P2Y4 receptor is determined by the second extracellular loop. *J Biol Chem*, 279:11456–11464.
- Hess CN, Kou R, Johnson RP, Li GK, Michel T. 2009. ADP Signalling in Vascular Endothelial Cells. *J Biol Chem*, 284:32209-32224.
- Hoebertz A, Mahendran S, Burnstock G, Arnett TR. 2002. ATP and UTP at low concentrations strongly inhibit bone formation by osteoblasts: a novel role for P2Y2 receptor in bone remodeling. *J Cell Biochem*, 86:413-419.
- Hopfner M, Lemmer K, Jansen A, Hanski C Riecken EO. 1998. Expression of functional P2-purinergic receptors in primary cultures of human colorectal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 251:811-817.
- Hou M. Harden YK, Baldetorp B, Lazarowski E, Pendergast W, Möller S, Edvinsson L, Erlinge D. 2002. UDP acts as a growth factor for vascular smooth muscle cells by activation of P2Y(6) receptors. *Am J Physiol*, 282:H784-792.
- Hou M, Muller S, Edvison L, Erlinge D. 2000. Cytokines induce upregulation of vascular P2Y2 receptors and increased mitogenic responses to UTP and ATP. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20:2064-2069.
- Housley GD, Jagger DJ, Greenwood D, Raybould NP, Salih SG, Jarlebark LE, Vlajkovic SM, Kanjhan R, Nikolic P, Munoz DJ, Thorne PR. 2002. Purinergic regulation of sound transduction and auditory neurotransmission. *Audiol Neurootol*, 7:55–61.
- Hu H, O'Mullane LM, Cummins MM, Campbell CR, Hosada Y, Poronnik P, Dinudom A, Cook DI. 2010. Negative regulation of Ca^{2+} influx during P2Y₂ purinergic receptor activation is mediated by G $\beta\gamma$ -subunits. *Cell Calcium*, 47:55-64.
- Hua W, Christianson T, Rougeot C, Rochefort H, Clinton GM. 1995. SKOV3 ovarian carcinoma cells have functional estrogen receptor but are growth-resistant to estrogen and antiestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 55:279-89.
- Hughes AR, Putney JW. 1990. Inositol phosphate formation and its relationship to calcium signaling. *Environ Health Perspect*, 84: 141-147.
- Huwiler A, Pfeilshifter J. 1994. Stimulation by extracellular ATP and UTP of the mitogen-activated protein kinase cascade and proliferation of rat renal mesangial cells. *Br J*

Pharmacol, 113:1455-1463.

Illes P, Ribeiro A. 2004. Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system. *Eur J Pharmacol*, 483: 5-17.

Inoue K, 2007. UDP facilitates microglial phagocytosis through P2Y6 receptors. *Cell Adh Migr*, 1:131-132.

Inoue K, Koizumi S, Kataoka A, Tozaki-Saitoh H, Tsuda M. 2009. P2Y(6)-Evoked Microglial Phagocytosis. *Int Rev Neurobiol*, 85:159-63.

Janssens R, Boeynaems JM. 2001. Effects of extracellular nucleotides and nucleosides on prostate carcinoma cells. *Br J Pharmacol*, 132:536-546.

Katabuchi H, Okamura H. 2003. Cell biology of human ovarian surface epithelial cells and ovarian carcinogenesis. *Medical Electron Microscopy*, 36: 74-86.

Katz B, Miledi R. 1970. Further study of the role of calcium in synaptic transmission. *J Physiol*, 207:789-801.

Kellerman D, Evans R, Mathews D, Shaffer C. 2002. Inhaled P2Y2 receptor agonists as a treatment for patients with cystic fibrosis lung disease. *Adv Drug Deliv Rev*, 54:1463-1474.

Kennedy C, Burnstock G. 1985. Evidence for two types of P2-purinoceptor in longitudinal muscle of the rabbit portal vein. *Eur J Pharmacol*, 23;111:49-56.

Kennedy C, Qi AD, Herold CL, Harden TK, Nicholas RA. 2000. ATP, an agonist at the rat P2Y4 receptor, is an antagonist at the human P2Y4 receptor. *Mol Pharmacol*, 57:926-931.

Keppens S, De Wulf H. 1986. Characterization of the liver P2-purinoceptor involved in the activation of glycogen phosphorylase. *Biochem J*, 240:367-371.

Khak BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA; Séguéla P, Voigt M, Humphrey PPA. 2001. International Union of Pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacological Reviews*, 53:107-118.

Kim B, Jeong HK, Kim JH, Lee SY, Jou H, Joe EH. 2011. Uridine 5[′]-diphosphate induces chemokine expression in microglia and astrocytes through activation of the P2Y6 receptor. *J Immunol*, 186:3701-3709.

Koshiba M, Apasavov S, Sverdlov V, Chen P, Erb L, Turner JT, Weisman GA, Sitkovsky MV. 1997. Transient up-regulation of P2Y2 nucleotide receptor mRNA expression is an immediate early gene response in activated thymocytes. *Proc Natl Acad Sci*, 94:831-836.

Köttgen M, Löffler T, Jacobi C, Nitschke R, Pavenstädt H, Scheriber R, Frische S, Nielsen S, Leipziger J. 2003. P2Y6 receptor mediates colonic NaCl secretion via differential activation of cAMP-mediated transport. *J Clin Invest*, 111:371-379.

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

- Kulkarni PS, Wakade AR, Kirpekar SM. 1976. Sympathetic innervation of guinea pig uterus and ovary. *Am J Physiol*, 230:1400-1405.
- Kumari R, Goh G, Ng LL, Boarder MR. 2003. ATP and UTP responses of cultured rat aortic smooth muscle cells revisited: dominance of P2Y2 receptors. *Br J Pharmacol*, 140:1169-1176..
- Künzli BM, Berberat PO, Giese T, Csizmadia E,, Kaczmareck E, Baker C, Halaceli I, Büchler MW, Friess H, Robson SC. 2006. Upregulation of CD39/NTPDases and P2 receptor in human pancreatic disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292: G223-G230.
- Kuroda H, Mandai M, Konishi I, Tsuruta Y, Kusaraki T, Kariya M, Fujii S. 2001. Human ovarian surface epithelial (OSE) cells express LH/hCG receptors, and HCG inhibits apoptosis of OSE cells via up-regulation of insulin-like growth factor-1. *Int J Cancer*, 91: 309-315.
- Lara HE, Belmar J. 1991. Release of norepinephrine from the cat ovary: changes after ovulation. *Biol Reprod*, 44:752-759.
- Lara HE, Dorfman M, Venegas M, Luza SM, Luna SL, Mayerhofer A, Guimaraes MA, Rosa E Silva AA, Ramirez VD. 2002. Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary during a normal estrous cycle and in polycystic ovary syndrome: Studies on norepinephrine release. *Microsc Res Tech*, 5:495-502.
- Lazarowski ER, Rochelle LG, O'Neal WK, Ribeiro CM, Grubb BR, Zhang V, Harden TK, Boucher RC. 2001. Cloning and functional characterization of two murine uridine nucleotide receptors reveal a potential target for correcting ion transport deficiency in cystic fibrosis gallbladder. *J Pharmacol Exp Ther*, 297:43-49.
- Lee SC, Vielhauer NS, Leavr EV, Pappone PA. 2005. Differential Regulation of Ca²⁺ Signalling and Membrane Trafficking by Multiple P2 Receptors in Brown Adipocytes. *J Membrane Biol*, 207:131-142
- Leroy-Dudal J, Kellouche S, Gauduchon P, Carreiras F. 2008. La micro-écologie des tumeurs épithéliales de l'ovarie. *Bull Cancer*, 95: 829-839.
- Li Q, Olesky M, Palmer RK, Harden TK, and Nicholas RA. 1998. Evidence that the p2y3 receptor is the avian homologue of the mammalian P2Y6 receptor. *Mol Pharmacol*, 54:541-546.
- Li X, Qi X, Zhou L, Catera D, Rote NS, Potashkin J, Abdul-Karim FW, Gorodeski GI. 2007. Decreased expression of P2X7 in endometrial epithelial pre-cancerous and cancer cells. *Gynecol Oncol*, 106: 233-243.
- Lin WW, Lee YT. 1996. Pyrimidinoceptor-mediated activation of phospholipase C and phospholipase A₂ in RAW 264.7 macrophages. *Br J Pharmacol*, 119:261-268.
- Lustig KD, Shiau AK, Brake AJ, Julius D. 1993. Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci*, 90:5113-.5117.
- MacKenzie AB, Surprenant A, North RA. 1999. Functional and molecular diversity of purinergic ion channel receptors. *Ann N Y Acad Sci*, 30:716-729.

- Maehara Y, Kusumoto H, Anai H, Kusumoto T, Sugimachi K. 1987. Human tumor tissues have higher ATP contents than normal tissues. *Clinica Chimica Acta*, 169:341-344.
- Maines-Bandiera SL, Kruk PA, Auersperg N. 1992. Simian virus 40-transformed human ovarian surface epithelial cells escape normal growth controls but retain morphogenetic responses to extracellular matrix. *Am J Obstet Gynecol*, 167:729-735.
- Malam-Souley R, Seye C, Gadeau AP, Loirand G, Pillois X, Campan M, Paccud P. 1996. Nucleotide receptor P2u partially mediates ATP-induced cell cycle progression of aortic smooth muscle cells. *J Cell Physiol*, 166:57-65.
- Marcus DC, Scofield MA. 2001. Apical P2Y4 purinergic receptor controls K⁺ secretion by vestibular dark cell epithelium. *Am J Physiol*, 281:C282–C289.
- Martin KA, Kertesz SB, Dubyak GR. 1997. Down-regulation of P_{2U}-purinergic nucleotide receptor messenger RNA expression during in vitro differentiation of human myeloid leukocytes by phorbol esters or inflammatory activators. *Mol Pharmacol*, 51:97-108.
- Mikoshiba K, Hattori M. 2000. IP₃ Receptor-operated calcium entry. *Sci STKE*, 51:1-4.
- Miyagi Y, Kobayashi S, Ahmed A, Nishimura J, Fukui M, Kanaide H. 1996. P2U purinergic activation leads to the cell cycle progression from G1 to S and M phases but not from the G0 to G1 phase in the vascular smooth muscle cells in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun*, 222:652-658.
- Moore DJ, Chambers JK, Wahlin JP, Tan KB, Moore GB, Jemkins O, Emson PC, Murdock PR. 2001. Expression pattern of human P2Y receptor subtypes: a quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction study. *Biochim Biophys Acta*, 1521:107-119.
- Morales-Ledesma L, Linares R, Rosas G, Morán C, Chavira R, Cárdenas M, Domínguez R. 2010. Unilateral sectioning of the superior ovarian nerve of rats with polycystic ovarian syndrome restores ovulation in the innervated ovary. *Reprod Biol Endocrinol*, 8:99.
- Morris GE, Nelson CP, Everitt D, Brighton PJ, Standen NB, Challiss RAJ, Willets JM. 2011. G protein-coupled receptor kinase 2 and arrestin2 regulate arterial smooth muscle P2Y-purinergic receptor signaling. *Cardiovasc Res*, 89: 193-203.
- Murdoch WJ. 1994. Ovarian surface epithelium during ovulatory and anovulatory ovine estrous cycles. *Anat Rec*, 240: 322-326.
- Murdoch WJ, McDonnell AC. 2002. Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis. *Reproduction*, 123: 743-750.
- Naora H, Montell DJ. 2005. Ovarian cancer metastasis: integration insights from disparate model organisms. *Nature Reviews*, 5:355-366.
- Nguyen T, Erb L, Weisman GA, Marchese A, Garrad RC, George SR, Turner JT, O'Dowd BF. Cloning, expression, and chromosomal localization of the human uridine nucleotide receptor gene. *J Biol Chem*, 270:30845-30848.
- Nicholas RA, Walt WC, Lazarowski ER, Li Q, Harden K. 1996. Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, a UTP-selective and a ATP- and UTP –specific receptor. *Mol Pharmacol*,

50:224-229.

- Ninomiya JG, Suzuki H. 1983. Electrical responses of Smooth Muscle Cells of the Mouse Uterus to Adenosine Triphosphate. *J Physiol*, 342: 499-515.
- Nishida M, Ogushi M, Suda R, Toyotaka M, Saiki S, Kitajima N, Nakaya M, Kim K, Ide T, Sato Y, Inoue K, Kurose H. 2011. Heterologous down-regulation of angiotensin type 1 receptors by purinergic P2Y2 receptor stimulation through S-nitrosylation of NF- κ B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108:6662-6667.
- North RA. 2002. Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiol Rev*, 82: 1013-1067.
- North RA, Barnard EA. 1997. Nucleotide Receptors. *Curr Opin Neurobiol*, 7: 348-357.
- North RA, Surprenant A. 2000. Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 40:563-580.
- Nylund G, Hultman L, Nordgren S, Delbro DS. 2007. P2Y₂- and P2Y₄ purinergic receptors are over-expressed in human colon cancer. *Auton Autacoid Pharmacol*, 27: 79-84.
- Nylund G, Nordgren S, Delbro DS. 2004. Expression of P2Y₂ purinoceptors in MCG 101 murine sarcoma cells, and HT-29 human colon carcinoma cells. *Auton Neurosci*, 112:69-79.
- Ong A, Maines-Bandiera S, Roskelley CD, Auersperg N. 2000. An ovarian adenocarcinoma line derived from SV40/E-cadherin transfected normal human ovarian surface epithelium. *Int J Cancer*, 85: 430-437.
- Okamoto S, Okamoto A, Nikaido T, Takao M, Yanaihara N, Takakura S, Ochiai K, Tanaka T. 2009. Mesenchymal to epithelial transition in the human ovarian surface epithelium focusing on inclusion cysts. *Oncol Rep*, 21: 1209-1214.
- Okamura H, Katabuchi H. 2001. Detailed morphology of human ovarian surface epithelium focusing on its metaplastic and neoplastic capability. *Ital J Anat Embryol*, 106: 236-276.
- Okamura H, Katabuchi H, Nitta M, Ohtake H. 2006. Structural Changes and Cell properties of Human Ovarian Surface Epithelium in Ovarian Microsc Res Tech, 69:469-481.
- Okamura H, Katabuchi H, Ohba T. 2003. What we have learned from isolated cells from human ovary? *Mol Cell Endocrinol*. 202:37-45.
- Osterholzer HO, Johnson JH, Nicosia SV. 1985a. An Autoradiographic study of rabbit ovarian surface epithelium before and during ovulation. *Biol Reprod*, 33: 729-738.
- Osterholzer HO, Streibel EJ, Nicosia SV. 1985b, Growth effects of protein hormones on cultured rabbit ovarian surface epithelial cells. *Biol Reprod*, 33: 247-258.
- Ouchi T, Monteiro ANA, August A, Aaronson SA, Hanafusa H. 1998. BRCA1 regulates p53-dependent gene expression. *Proc Natl Acad Sci*, 95:2302-2306.
- Oshimi Y, Miyazaki S, Oda S. 1999. ATP-induced Ca²⁺ response mediated by P2U and P2Y purinoceptors in human macrophages: signalling from dying cells to macrophages. *Immunology*, 98:220-227.

- Parker MS, Onyenekwu NN, and Bobbin RP. 2003. Localization of the P2Y4 receptor in the guinea pig organ of Corti. *J Am Acad Audiol*, 14:286–295.
- Parkes AS. 1928. The Length of the oestrous cycle in unmated normal mouse: records of one thousand cycles. *J Exp Biol*, 5:371-377.
- Parr CE, Sullivan DM, Paradiso AM, Lazarowski ER, Burch LH, Olsen JC, Erb L, Weisman GA, Boucher RC, and Turner JT. 1994. Cloning and expression of a human P2U nucleotide receptor, a target for cystic-fibrosis pharmacotherapy. *Proc Natl Acad Sci*, 91:3275–3279.
- Pelegriin P, Surprenant A. 2006. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J*, 25:5071-5082.
- Penner R, Fasolato C, Hoth M. 1993. Calcium influx and its control by calcium release. *Curr Opin Neurobiol*, 3:368-374.
- Popper LD, Batra S. 1993. Calcium mobilization and cell proliferation activated by extracellular ATP in human ovarian tumour cells. *Cell Calcium*, 14:209-218.
- Pothuri B, Laeitao MM, Levine DA, Viale A, Olshen AB, Arroyo C, Bogomolnii F, Olvera N, Lin O, Soslow RA, Robson ME, Offit K, Barakat RR, Boyd J. 2010. Genetic analysis of the early natural history of epithelial carcinoma. *PLoS one* 5: e10358.
- Putney JW. 1987. Formation and actions of calcium-mobilizing messenger inositol 1,4,5-trisphosphate. *Am J Physiol*, 252: G149-G157
- Putney JW. Store-operated calcium channels Chapter 113 en *Handbook of Cell Signalling* 2nd ed. 2010. Elsevier Inc.USA.
- Putney JW, Takemura H, Hughes AR, Hortsman DA, Thastrup O. 1989. How do inositol phosphates regulate calcium signaling? *FASEB Journal*, 3:1899-1905.
- Putney JW, Broad LM, Braun F, Lievremont JP, Bird GS. 2001. Mechanisms of capacitative calcium entry. *J Cell Sci*, 114:2223-229.
- Qi AD, Wolff SC, Nicholas RA. 2005. The apical targeting signal of the P2Y2 receptor is located in its first extracellular loop. *J Biol Chem*, 280:29169-29175.
- Ralevic V, Burnstock G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*, 50: 413-492.
- Rangel GE, Garay E, Arellano RO. 2007. El ATP como transmisor químico extracelular. *Rev Mex Neuro*, 8: 276-285.
- Rice WR, Burton FM, Fiedeldej DT. 1995. Cloning and expression of the alveolar type II cell P_{2U}-purinergic receptor. *Am J Resp Cell Mol Biol*, 12:27–32.
- Riegel AK, Faigle M, Zug S, Rosenberg P, Robaye B, Boeynaems JM, Idzko M, Eltzchig HK. 2011. Selective induction of endothelial P2Y6 nucleotide receptor promotes vascular inflammation. *Blood*. 117:2548-2555.
- Robaye B, Boeynaems JM, Communi D. 1997. Slow desensitization of the human P2Y6 receptor. *Eur J Pharmacol*, 329:231–236.
- Robaye B, Ghanem E, Wilkin F, Fokan D, van Driessche W, Schurmans S, Boeynaems

- JM, Beauwens R. 2003. Loss of nucleotide regulation of epithelial chloride transport in the jejunum of P2Y₄-null mice. *Mol Pharmacol*, 63:777-783.
- Roberts JA, Vial C, Digby HR, Agboh KC, Wen H, Atterbury-Thomas A, Evans RJ. 2006. Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch*, 425:486-500.
- Ronca-Testoni S, Galbani P, Gambacciani M. 1984. Some properties of a purinergic receptor solubilized from human uterus membranes. *FEBS Letters* 172: 335-338.
- Sage CL, Marcus DC. 2002. Immunolocalization of P2Y₄ and P2Y₂ purinergic receptors in strial marginal cells and vestibular dark cells. *J Membr Biol*, 185:103–115.
- Sak K, Boeynaems J, Everaus H. 2003. Involvement of P2Y receptors in the differentiation of haematopoietic cells. *J Leuk Biol*, 442-447.
- Saldaña C, Garay E, Rangel GE, Reyes LM, Arellano RO. 2008. Native ion current coupled to purinergic activation via basal and mechanically induced ATP release in *Xenopus* follicles. *J Cell Physiol*, 218: 355-365.
- Salido GM, Sage SO, Rosado JA. 2009. Biochemical and functional properties of the store-operated Ca²⁺ channels. *Cell Signal*, 21:457-461.
- Salido GM, Sage SO, Rosado JA. 2009. TRPC channels and store-operated Ca²⁺ entry. *Biochim Biophys Acta*, 1793:223-230.
- Seye CI, Kong Q, Erb L, Garrad RC, Krugh B, Wang M, Turner JT, Sturek M, Gonzalez FA, Weisman GA. 2002. Functional P2Y₂ nucleotide receptors mediate uridine 5'-triphosphate induced intimal hyperplasia in collared rabbit carotid arteries. *Circulation*, 106:2720-2726.
- Schafer R, Sedehizade F, Welte T, reiser G. 2003. ATP- and UTP-activated P2Y receptors differently regulate proliferation of human lung epithelial tumor cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 285:L376-L385.
- Schuetz AW, Lessman C. 1982. Evidence for follicle wall involvement in ovulation and progesterone production by frog (*Rana pipiens*) follicles in vitro. *Differentiation*. 22:79:84.
- Schultze-Mosgau A, Katzur AC, Arora KK, Stojilcovic SS, Diedrich K, Ortmann O. 2000. Characterization of calcium-mobilizing, purinergic P2Y₂ receptors in human ovarian cancer cells. *Mol Hum Reprod*, 6: 435-442.
- Scully RE. 1995. Pathology of ovarian cancer precursors. *J Cell Biochem Suppl*, 23:208-218.
- Solini A, Santini E, Chimenti D, Chiozzi P, Pratesi F, Cuccato S, Falzoni S, Lupi R, Ferrannini E, Pugliese G, Di Virgilio F. 2007. Multiple P2X receptors are involved in the modulation of apoptosis in human mesangial cells: evidence for role of P2X₄. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292: 537-547.
- Soltoff SP. 1998. Related adhesion focal tyrosine kinase and the epidermal growth factor receptor mediate the stimulation of mitogen-activated protein kinase by G-protein-coupled P^Y receptor. Phorbol ester or [Ca²⁺]_i elevation can substitute for receptor activation. *J Biol Chem*, 273:23110-23117.

- Soltoff SP, Avraham H, Avraham S, Cantley LC. 1998. Activation of P2Y2 receptors by UTP and ATP stimulates mitogen-activated kinase activity through a pathway that involves related adhesion focal tyrosine kinase and protein kinase C. *J Biol Chem*, 273:2653-2660.
- Spassova MA, Soboloff J, He L, Hewavitharana T, Xu W, Venkatachalam K, van Rossum DB, Patterson RL, Gill DL. 2004. Calcium entry mediated by SOCs and TRP channels: variations and enigma. *Biochim Biophys Acta*, 1742:9-20.
- Stockard, Papanicolaou GN. 1917. A rhythmical Heat Period in the Guinea-Pig. *Science*, 46: 42-44.
- Stagg J, Smyth MJ. 2010. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene*, 29:5346-5358.
- Stojilkovic SS, He M, Koshimizu T, Balik A, Zemkova H. 2010. Signalling by purinergic receptors and channels in pituitary gland. *Mol Cell Endocrinology*, 314: 184-191.
- Suárez-Huerta N, Pouillon V, Boeynaems J, Robaye B. 2001. Molecular cloning and characterization of the mouse P2Y4 nucleotide receptor. *Eur J Pharmacol*, 416:197-202.
- Tai CJ, Kang SK, Tzeng CR, Leung PC. 2001. Adenosine triphosphate activates mitogen-activated protein kinase in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology*, 142: 1554-1560.
- Teixeira M, Butlen D, Ferrary E, Sterkers O, Escoubet B. 2000. Identification of uridine 5'-triphosphate receptor mRNA in rat cochlear tissues. *Acta Otolaryngol*, 120:156–159.
- Tu MT, Luo SF, Wang CC, Chien CS, Chiu CT, Lin CC, Yang CM. 2000. P2Y2 receptor-mediated proliferation of C₆ glioma cells via activation of Ras/Raf/MEK/MAPK pathway. *Br J Pharmacol*, 129:1481-1489.
- Turner JT, Weisman GA, Camden JM. 1997. Upregulation of P2Y2 nucleotide receptors in rat salivary gland cells during short-term culture. *Am J Physiol*, 3:C1100-1107.
- Vázquez-Cuevas FG, Cruz-Rico A, Garay E, Arellano RO. 2011. Functional P2X₇ receptors in ovarian superficial epithelium from mouse and human (Publicación pendiente, artículo en preparación).
- 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 Dev*, 73: 745-755.
- Vázquez-Cuevas FG, Zárate-Díaz EP, Garay E, Arellano RO. 2010. Functional expression and intracellular signalling of UTP-sensitive P2Y receptors in theca-interstitial cells. *Reprod Biol Endocrinol*, 14;8:88.
- von Kügelgen I, Wetter A. 2000. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 362: 310-323.
- Von Kügelgen I, Harden TK. 2011. Molecular pharmacology, physiology, and structure of the P2Y receptors. *Adv Pharmacol*, 61:373-415.
- Wang EC, Lee J, Ruiz WG, Balestreire EM, von Bodungen M, Barrick S, Cockayne DA,

- Birder LA, Apodaca G. 2005. ATP and purinergic receptor-dependent membrane traffic in bladder umbrella cells. *J Clin Invest*, 115:2412-2422.
- Wang Q, Wang L, Feng Y, Li X, Zeng R, Gorodeski G. 2004. P2X₇ receptor-mediated apoptosis of human cervical epithelial cells. *Am J Physiol*, 287:C1349-C1358.
- Westfall DP, Todorov LD, Mihaylova-Todorova ST. 2002. ATP as a Cotransmitter in sympathetic nerves and its inactivation by releasables enzymes. *J Pharmacol Exp Ther*, 303: 439-444.
- Webb TE, Henderson DJ, Roberts JA, Barnard. 1998. Molecular cloning and characterization of the rat P2Y₄ receptor. *J Neurochem*, 71:1348–1357.
- Wilden PA, Agazie YM, Kaufman R, Halenda SP. 1998. ATP stimulated smooth muscle cell proliferation requires independent ERK and PI3K signaling pathways. *Am J Physiol*, 4:H1209-1215.
- Wildman SS, Unwin RJ, King BF. 2003. Extended pharmacological profiles of rat P2Y₂ and rat P2Y₄ receptors and their sensitivity to extracellular H⁺ and Zn²⁺ ions. *Br J Pharmacol*, 140:1177-1186.
- Wong AS, Leung PC. 2007. Role of endocrine and growth factors on the ovarian surface epithelium. *J Obstet Gynaecol Res*, 33: 3-16.
- Wong AS, Maines-Bandiera SL, Rosen B, Wheelock MJ, Johnson KR, Leung PC, Roskelley CD, Auersperg N. 1999. Constitutive and conditional cadherin expression in cultured human ovarian surface epithelium: influence of family history of ovarian cancer. *Int J Cancer*, 81: 180-188.
- Wright JW, Pejovic T, Jurevic L, Bishop CV, Hobbs T, Stouffer RL. 2011. Ovarian surface epitheliectomy in the non-human primate: continued cyclic ovarian function and limited epithelial replacement. *Hum Reprod*, 26:1422-1430.
- Xing M, Post S, Ostrom RS, Samardzija M, Insel PA. 1999. Inhibition of phospholipase A₂-mediated arachidonic acid release by cyclic AMP defines a negative feedback loop for P2Y receptor activation in Madin-Darby canine kidney D1 cells. *J Biol Chem*, 274:10035-10038.
- Xu B, Stephens A, Kirschenheuter G, Greslin AF, Cheng X, Sennelo J, Cattaneo M, Zighetti ML, Chen A, Kim SA, Kim HS, Bischofberger N, Cook G, Jacobson KA. 2002. Acyclic analogues of adenosine bisphosphates as P2Y receptor antagonists: phosphate substitution leads to multiple pathways of inhibition of platelet aggregation. *J Med Chem*, 45:5694-5709.
- Xu J, Chalimoniuk M, Shu Y, Sun AY, Gonzalez FA, Weisman GA, Wood WG, Sun GY. 2003. Prostaglandine E₂ production in astrocytes: regulation by cytokines, extracellular ATP, and oxidative agents. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 69:437-448.
- Yoon Mj, Lee HJ, Kim DK. 2006. Extracellular ATP induces apoptotic signaling in human monocyte leukemic cells, HL-60 y F-36P. *Arch Pharm Res*, 29:1032-1041-
- Zambon AC, Hughes RJ, Meszaros JG, Wu JJ, Torres B, Brunton LL, Insel PA. 2000. P2Y₂ receptor of MDCK cells: cloning, expression, and cell-specific signaling. *Am J*

Physiol, 279:F1045–F1052.

Zhang H, Li Z, Viklund EK, Strömblad S. 2002. P21-activated kinase 4 interacts with integrin alpha v beta 5 and regulates alpha v beta 5-mediated cell migration. J Cell Biol, 158:1287-1297.

Zhang Z, Wang Z, Ren H, Yue M, Huang K, Gu H, Liu M, Du B, Qian M. 2011. P2Y6 agonist uridine 5"-diphosphate promotes host defense against bacterial infection via monocyte chemoattractant protein-1-mediated monocytes/macrophages recruitment. J Immunol, 186:5376-5387.

Zheng W, Magid MS, Kramer EE, Chen YT. 1996. Follicle-stimulating hormone receptor is expressed in human ovarian surface epithelium and fallopian tube. Am J Pathol, 148: 47-50.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Ovario adulto de humano
- Figura 2 Células de frotis vaginal de ratona
- Figura 3 Marcaje por inmunofluorescencia de queratina en células del OSE de ratón
- Figura 4 Preparaciones *in vitro* de células OSE, células MM14.Ov y células SKOV3
- Figura 5 Secuencia de imágenes de la activación celular por fluorescencia
- Figura 6 Mapa de la respuesta en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en células MM14.Ov
- Figura 7 Respuestas a ATP, UTP o UDP en cultivos primarios de OSE
- Figura 8 Respuestas a ATP, UTP o UDP en células MM14.Ov
- Figura 9 Respuestas a ATP, UTP o UDP en células SKOV3
- Figura 10 Marcaje por inmunofluorescencia de los receptores P2Y2
- Figura 11 Marcaje por inmunofluorescencia de los receptores P2Y4
- Figura 12 Marcaje por inmunofluorescencia de los receptores P2Y6