



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**EXPRESIÓN DE RECEPTORES PURINÉRGICOS EN CÉLULAS INICIADORAS DE
TUMORES DE CARCINOMA OVÁRICO**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO (A) EN CIENCIAS

PRESENTA:
ALEJANDRA DÍAZ JIMÉNEZ

TUTOR:
DR. FRANCISCO GABRIEL VÁZQUEZ CUEVAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DR. LUIS ROBERTO RODRÍGUEZ ORTÍZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
DRA. TATIANA FIORDELISIO COLL
FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

JURIQUILLA, QUERÉTARO, OCTUBRE 2021



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.

Esta tesis se realizó en el laboratorio B11 “Fisiología Celular” del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, campus Juriquilla, Querétaro, bajo la dirección del Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas. El comité tutorial estuvo conformado por la Dra. Tatiana Fiordelisis Coll y el Dr. Luis Roberto Rodríguez Ortíz. El trabajo fue financiado por los donativos de PAPIIT-DGAPA-UNAM IN202620 e IN202121. Alejandra Díaz Jiménez contó con una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CVU: 873176) para estudios de Maestría. Agradecemos el apoyo del personal técnico del laboratorio B11, de la Unidad de Microscopía, de la Unidad de Proteogenómica, de la Unidad de Cómputo y del Bioterio del INB.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Al Instituto de Neurobiología de la UNAM.

Al Dr. Francisco Vázquez Cuevas por sus enseñanzas, paciencia y disposición en esta etapa formativa.

Al Dr. Mauricio Díaz Muñoz por la crítica constructiva y por el apoyo para realizar los experimentos dentro del Laboratorio de Fisiología Celular.

A la Dra. Tatiana Fiordelisio Coll y el Dr. Luis Roberto Rodríguez miembros del comité tutor, por sus valiosas aportaciones.

A los miembros del jurado por la revisión, corrección y comentarios al presente escrito.

A la Dra. Nuri Aranda López y a la secretaria Ma.Carmen Mendoza López por su valiosa ayuda en los trámites administrativos.

A mis amigos del B11 por todo su apoyo.

A David, Erandi, Fer, Ale, Ana y Eliseo por hacer de la maestría una experiencia inolvidable.

A Sara Laura, Sonia, Alfredo, Herme y Ángela.

RESUMEN

El cáncer ovárico se caracteriza por su alta tasa de mortalidad a causa de su resistencia al tratamiento. En respuesta al estrés generado por la terapia, una pequeña población celular con características troncales, son seleccionadas y sostienen la recurrencia de la enfermedad; se les ha denominado *células iniciadoras de tumores* (CIT).

El tratamiento con CoCl_2 , es un modelo experimental que se utiliza para la selección de las CIT, el cual actúa estabilizando a HIF-1 α y así se mimetiza el proceso de hipoxia, condición en la que se ha propuesto se encuentran las CIT al interior del microambiente tumoral. Además se ha reportado que HIF-1 α puede inducir la regulación positiva del receptor purinérgico P2Y2.

El objetivo del trabajo fue caracterizar las respuestas purinérgicas en CIT en comparación con la línea parental, utilizando registro de la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Las CIT fueron seleccionadas incubando los cultivos con CoCl_2 (300 μM), por 3, 4 ó 5 días. Los marcadores fenotípicos fueron caracterizados por RT-PCR e inmunofluorescencia. Las respuestas a ATP y UTP sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, se estudiaron por microscopía de fluorescencia in vivo.

La línea SKOV-3 mostró una respuesta significativamente mayor a ATP que a UTP, lo que sugiere la expresión de más de una población de receptores, incluyendo al P2Y2R. El tratamiento con CoCl_2 indujo el enriquecimiento de células con características de CCGP. Las células tratadas con CoCl_2 disminuyeron su respuesta a ATP en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, en comparación con células control, pero no hubo cambios ante la estimulación con UTP, lo que permite sugerir que los P2Y2R mantienen su expresión, pero otros subtipos de receptores purinérgicos son expresados diferencialmente.

El análisis de la dinámica subcelular de Ca^{2+} mostró un incremento significativo de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en los núcleos de las células SKOV-3 parentales ante la estimulación con ATP o UTP, que no se registró en las células tratadas con CoCl_2 , lo cual puede implicar diferencias en la regulación de la expresión génica y la existencia de una vía de señalización conformada por HIF-1 α y P2Y2R en la regulación de la dinámica de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de las CCGP. Este estudio muestra que las CCGP presentan un manejo diferencial del Ca^{2+} en respuesta a agonistas purinérgicos, lo que refleja cambios adaptativos que les permiten resistir condiciones de estrés celular como las terapias anticáncer.

SUMMARY

Ovarian cancer is the leading cause of death from a gynecologic malignancy. In ovarian cancer most patients will ultimately develop tumor recurrence and succumb to chemoresistant disease. In several hematologic and solid tumors, subpopulations of cells termed called “cancer stem cells” (CSCs) or “tumor initiating cells” (TICs) have been identified as representing the most tumorigenic and treatment-resistant cells within a heterogeneous tumor mass.

One of the most commonly used models to select the TICs, is cobalt chloride-induced chemical hypoxia because it stabilizes hypoxia inducible factors 1 α (HIF-1 α) under normoxic conditions. Previous studies mention that TICs are found in hypoxic conditions in the tumor microenvironment. In addition, there is evidence that of HIF-1 α can induce the upregulation of the purinergic receptor P2Y₂.

The objective of the work was to characterize the purinergic responses in TICs in comparison with the parental line, using recordings of the intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i). The TICs were selected by incubating cell cultures with CoCl₂ (300 μ M), for 3, 4 or 5 days. Phenotypic markers were characterized by RT-PCR and immunofluorescence. The responses to ATP and UTP on [Ca²⁺]_i were studied by fluorescence microscopy in vivo.

The SKOV-3 line showed a significantly greater response to ATP than to UTP, suggesting the expression of more than one receptor population, including P2Y₂R. Treatment with CoCl₂ induced the enrichment of cells with TICs characteristics. Cells treated with CoCl₂ decreased their response to ATP in [Ca²⁺]_i, compared to control cells, but there were no changes when stimulated with UTP, suggesting that P2Y₂R maintain their expression, but other purinergic receptor subtypes are differentially expressed.

The analysis of the subcellular dynamics of Ca²⁺ showed a significant increase in [Ca²⁺]_i in the nuclei of the parental SKOV-3 cells when stimulated with ATP or UTP, which was not recorded in the cells treated with CoCl₂, which may imply differences in the regulation of gene expression and the existence of a signaling pathway that involves of HIF-1 α and P2Y₂R in the regulation of the [Ca²⁺]_i dynamics of TICs. This study shows that TICs present a differential regulation of Ca²⁺ in response to purinergic agonists, reflecting adaptive changes that allow them to resist conditions of cellular stress such as anticancer therapies.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN | 10 |
| ANTECEDENTES | 12 |
| SISTEMA PURINÉRGICO | 12 |
| CÁNCER DE OVARIO | 16 |
| Modelo estocástico vs Modelo jerárquico | 20 |
| CÉLULAS INICIADORAS DE TUMORES | 21 |
| CÉLULAS CANCERÍGENAS GIGANTES POLIPLOIDES | 24 |
| Hipoxia | 25 |
| CoCl ₂ como un modelo experimental | 28 |
| SISTEMA PURINÉRGICO EN EL CÁNCER | 30 |
| LA SEÑALIZACIÓN PURINÉRGICA Y LA TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA | 32 |
| JUSTIFICACIÓN | 36 |
| HIPÓTESIS | 37 |
| OBJETIVOS | 37 |
| Objetivo General | 37 |
| Objetivos específicos | 37 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 38 |
| Cultivo celular | 38 |
| Enriquecimiento de células gigantes poliploides a partir de cultivos de células SKOV-3 | 38 |
| Marcaje del citoesqueleto con faloidina-rodamina y medición de núcleos | 38 |
| Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa | 39 |
| Marcaje por inmunofluorescencia | 39 |
| Registro de [Ca²⁺]_i por microscopia funcional | 40 |
| Procesamiento de señales de Ca²⁺ | 41 |
| Análisis estadístico | 42 |
| RESULTADOS | 43 |
| Células Cancerígenas Gigantes Poliploides | 43 |
| Marcadores de EMT y troncalidad | 46 |
| Respuesta de la [Ca²⁺]_i inducida por ATP y UTP | 49 |
| Patrón temporal de la movilización de Ca²⁺ en CCGP inducido por ATP o UTP | 54 |
| Patrón intracelular de la movilización de Ca²⁺ inducido por ATP o UTP en CCGP | 57 |

| | |
|--|----|
| DISCUSIÓN | 63 |
| Modelo experimental de CCGP | 63 |
| Expresión e identidad de los receptores purinérgicos en células SKOV-3 intactas | 64 |
| Expresión e identidad de los Receptores Purinérgicos en CCGP | 65 |
| Dinámica intracelular de Ca²⁺ | 67 |
| CONCLUSIONES | 69 |
| PERSPECTIVAS | 70 |
| REFERENCIAS | 71 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Señalización Purinérgica..... | 14 |
| Figura 2. Subtipos de carcinomas ováricos. | 18 |
| Figura 3. Mecanismo celular regulador dependiente de oxígeno. | 27 |
| Figura 4. UTP induce incremento en la expresión de vimentina que es inhibido con AG1478. .. | 34 |
| Figura 5. CCGP seleccionadas con CoCl ₂ | 44 |
| Figura 6. Análisis de la longitud de los núcleos en CCGP. | 45 |
| Figura 7. Expresión de marcadores de EMT en células tratadas con CoCl ₂ | 47 |
| Figura 8. Expresión de CD133 en células tratadas con CoCl ₂ | 48 |
| Figura 9. Imágenes representativas de registros de [Ca ²⁺] _i | 49 |
| Figura 10. Relación CR de la [Ca ²⁺] _i generada por ATP y UTP..... | 52 |
| Figura 11. Área bajo la curva (abc) tras la estimulación de ATP y UTP..... | 53 |
| Figura 12. Curso temporal de las respuestas generada por ATP. | 55 |
| Figura 13. Curso temporal de las respuestas generada por UTP..... | 56 |
| Figura 14. Imágenes de registros de [Ca ²⁺] _i en células SKOV-3 y con tratamiento de CoCl ₂ | 57 |
| Figura 15. UAF al interior de la célula..... | 58 |
| Figura 16. Trazos representativos del ΔF a través del tiempo en núcleos y células completas.. | 60 |
| Figura 17. Comparación del abc de células completas vs sus núcleos..... | 62 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Receptores P2Y que han sido clonados y la potencia de sus principales agonistas, así como sus mecanismos de transducción (Modificado de Burnstock, 2007)..... | 16 |
| Tabla 2. Número de acceso al NCBI, secuencia de los oligonucleótidos y longitud del amplicón, de los transcritos analizadas como marcadores de la EMT..... | 39 |
| Tabla 3. Valores obtenidos en las curvas CR de los diferentes tratamientos..... | 51 |

INTRODUCCIÓN

El cáncer ovárico (COv) es el octavo tipo de cáncer más común y la sexta causa de muerte relacionada a cáncer en mujeres a nivel mundial. En el 2018, en México se registró una incidencia aproximada a los 620,000 casos y 350,000 muertes, ocupando el tercer lugar en incidencia en cánceres ginecológicos, precediéndole el cáncer de mama en primer lugar y el cáncer cérvicouterino en segundo. El COv afecta principalmente a mujeres que se encuentran entre los 50 y los 70 años (Gallardo-Rincón, et al. 2011, Globocan, 2018).

Debido a su localización anatómica, y sintomatología poco diferenciada, y a pesar del uso de herramientas como la medición de un marcador tumoral sérico CA-125 y el ultrasonido transvaginal, no se ha logrado desarrollar un estudio de tamizaje con alto valor predictivo, lo que conlleva a un diagnóstico en etapas avanzadas (Ferlay et al, 2014); se estima que sólo el 25% de los casos son diagnosticados en estadios I y II, mientras que el 75% restante es diagnosticado en estadios III y IV (Jelovac & Armstrong, 2011). El diagnóstico tardío en este tipo de cáncer es un factor importante que contribuye a la alta tasa de mortalidad que caracteriza al COv, siendo la tasa de supervivencia a 5 años, menor al 30 por ciento (National Academies of Sciences, 2016).

El tratamiento de primera línea para el COv consiste en reducción quirúrgica y quimioterapia basada en agentes de platino (Cortez et al, 2018). Aunque más del 80% de estas mujeres se benefician de la terapia de primera línea, la recurrencia del tumor se produce en casi todos los pacientes con una mediana de 15 meses posterior al diagnóstico (Liu & Matulonis 2010). Los cánceres de ovario recurrentes pueden responder nuevamente a un tratamiento adicional, pero prácticamente todos ellos finalmente se vuelven resistentes a las terapias farmacológicas actuales (National Academies of Sciences, 2016).

Se ha propuesto que la alta recurrencia del COv es causada principalmente por la imposibilidad de erradicar por completo el tumor por medio de las estrategias de tratamiento tanto quirúrgicas como farmacológicas. Continuando con esta teoría, se cree que, entre las células cancerosas residuales se encuentra una subpoblación de células en particular a las que se les ha denominado con diferentes nombres, como son: células troncales de cáncer, células iniciadoras de tumores o células iniciadoras de cáncer, las cuales se ha observado tienen propiedades de

troncalidad inherentes o adquiridas que permiten la recurrencia de la enfermedad (Al-Alem, et al. 2019).

Dentro de las características que comparten esta subpoblación de células cancerosas a las que llamaremos en el presente trabajo, células iniciadoras de tumores (CIT), con las células troncales normales, se encuentran la división asimétrica, la capacidad de desintoxicación y la reparación del ADN, las cuales resultan fundamentales para que estas células logren resistencia al tratamiento y posteriormente promuevan la recurrencia del cáncer (Al-Alem, et al. 2019).

De igual manera, a las CIT se les ha atribuido la capacidad de sufrir metástasis por medio de la inducción de la transición epitelio-mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés) y del mecanismo inverso, la transición mesénquima-epitelio (MET), lo que les confiere rasgos malignos como motilidad, invasividad y resistencia a la apoptosis. Permitiendo así, la diseminación de las CIT a tejidos secundarios, donde proliferan, se diferencian e inician la formación de nuevos tumores (Mani, et al. 2008). Así mismo se ha propuesto que la inducción de EMT en células de cáncer está estrechamente relacionada con la adquisición de características troncales, por lo que podrían tratarse de un único proceso.

Estudios recientes han demostrado que la señalización purinérgica en células de carcinoma de varios orígenes puede inducir la EMT (revisado en Martínez-Ramírez y Vázquez-Cuevas, 2015). Más aún, estudios de nuestro grupo de trabajo han demostrado que la activación del receptor P2RY2 por trifosfato de uridina (UTP) en células SKOV-3 derivadas de carcinoma ovárico, induce la EMT (Martínez-Ramírez, et al. 2016). Por lo que la señalización purinérgica podría estar relacionada a la selección de células con características troncales o bien regular aspectos funcionales en dichas células.

Partiendo de la evidencia que demuestra que las células derivadas de carcinoma ovárico expresan receptores purinérgicos cuya actividad impacta aspectos funcionales como la proliferación celular, la migración y la inducción de la EMT (Pellegatti et al., 2008, Martínez-Ramírez, et al. 2015; DiVirgilio et al., 2018), el objetivo del presente trabajo es caracterizar la expresión de receptores purinérgicos en CIT de carcinoma ovárico, lo que podría aportar información relevante para futuras dianas terapéuticas que permitan reducir la resistencia a los tratamientos de primera línea y disminuir la alta letalidad de este tipo de cáncer.

ANTECEDENTES

SISTEMA PURINÉRGICO

Las “purinas” y “pirimidinas” fueron nombradas por primera vez a inicios del siglo XX por los científicos Fisher y Pinner respectivamente. Las investigaciones continuaron y en el año de 1929 se descubrió el trifosfato de adenosina o ATP de manera independiente por los investigadores Lohmann en Alemania y Fiske y SubbaRow en Estados Unidos; su papel en los procesos energéticos de la célula fue descrito en las siguientes décadas (Burnstock et al., 2010).

Sin embargo, el ATP no sólo funciona como fuente de energía del metabolismo celular, también puede fungir como un transmisor intercelular (Figura 1). En 1976, Burnstock observó que el ATP actuaba como co-transmisor al ser liberado con acetilcolina y noradrenalina de las vesículas sinápticas e inducía respuestas en las células del músculo liso del intestino, por lo que propuso que los nucleótidos tienen funciones como agonistas y ejercen sus acciones fisiológicas a través de receptores específicos de membrana, a los que denominó “receptores purinérgicos”. Posteriormente demostró que prácticamente todas las células pueden liberar ATP y los receptores purinérgicos se encuentran tanto en células nerviosas como no nerviosas (Burnstock, 2007).

Actualmente se sabe que la señalización purinérgica tiene efectos en procesos a corto plazo como la neurotransmisión, la neuromodulación y la secreción. Y en procesos a largo plazo, como la proliferación y la diferenciación celular, la motilidad y la muerte durante el desarrollo y en la regeneración (Burnstock & Verkhratsky, 2010).

En cuanto a la liberación extracelular del ATP, son varios los mecanismos encargados de mediar esta acción, como los hemicanales de conexina y panexina, canales maxianiónicos, canales aniónicos regulados por volumen y el receptor P2X₇, el cual es activado por ATP (figura 1); estos canales se activan ante estimulación mecánica o señales bioquímicas extracelulares, como cambios en el pH, estrés hipotónico, interacción huésped-patógeno, entre otros. Además de la liberación por canales, se ha mostrado que también se libera ATP por secreción granular excitotóxica, lisis celular, y coliberación en vesículas sinápticas con noradrenalina y acetilcolina (Corriden & Insel, 2010).

Una vez que el ATP se encuentra libre en el espacio extracelular, es hidrolizado a ADP, AMP y adenosina en cuestión de milisegundos en presencia de ecto-nucleotidasas que se encuentran ubicadas en la membrana plasmática. Las cuatro clases principales de ecto-nucleotidasas son: 1) ecto-nucleósido trifosfato difosfohidrolasas (E-NTPDasas), 2) ecto-nucleótido pirofosfatasa / fosfodiesterasa (E-NPP), 3) fosfatasas alcalinas (AP) y 4) ecto-5'-nucleotidasa (e5NT) (al-Rashida, & Iqbal, 2014); las cuales difieren en la especificidad de hidrólisis del sustrato, las E-NTPDasas y las E-NPPs hidrolizan ATP y ADP a AMP, que posteriormente se metaboliza a adenosina por las ecto-5'-nucleotidasas.

De esta manera, estas enzimas controlan la disponibilidad y diversidad de ligandos y por ende la activación de los receptores purinérgicos y así el ATP y sus metabolitos desfosforilados activan vías particulares de transducción en todas las células y tejidos; el resultado exacto depende de la combinación de receptores purinérgicos expuestos en la superficie celular, así como de cuántos elementos de respuesta diferentes están acoplados al sistema activo (Martínez-Ramírez & Vázquez-Cuevas, 2015).

Los receptores purinérgicos se clasifican en dos familias principales, receptores activados por adenosina, conocidos como receptores P1, de los cuales se han clonado y caracterizado cuatro subtipos: A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃; todos son receptores acoplados a proteínas G (GPCR) con siete dominios transmembranales. Típicamente, A₁ y A₃ se acoplan a la familia Gi/o de proteínas G que inhiben la producción de AMP cíclico (cAMP), mientras que A_{2A} y A_{2B} estimulan la producción de AMPc a través de proteínas Gs. Dependiendo del tipo de célula, se han revelado otras combinaciones de proteínas G y se demostró que todos los receptores de adenosina activan al menos una subfamilia de proteínas quinasas activadas por mitógeno (Schulte & Fredholm, 2003).

La segunda familia son los receptores activados por nucleótidos de adenina (ATP y ADP) y pirimidina (UTP y UDP), denominados receptores P2 (figura 1), los cuales se subdividen en función de sus características moleculares, estructurales y funcionales en receptores P2X y receptores P2Y (al-Rashida, & Iqbal, 2014; Martínez-Ramírez & Vázquez-Cuevas, 2015).

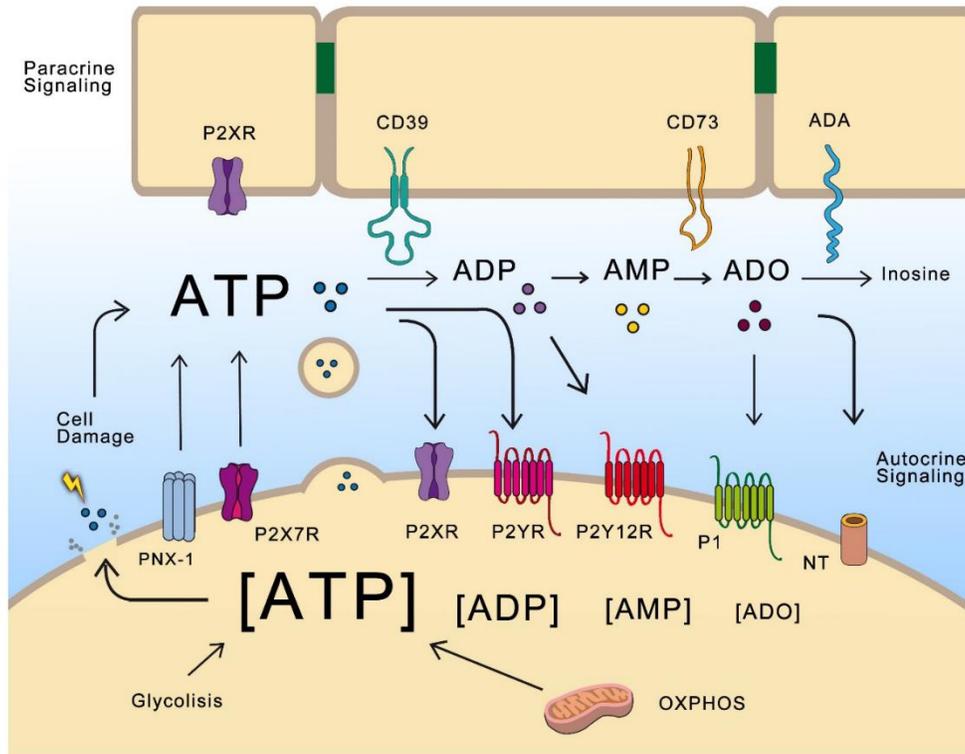


Figura 1. Señalización Purinérgica.

El ATP se produce de manera intracelular por fosforilación oxidativa (OXPHOS) y glucólisis, alcanzando concentraciones mM. Puede ser liberado al espacio extracelular por lisis celular, exocitosis, transportadores, hemicanales de pannexina-1 (PNX-1) y P2X7R. Una vez ubicado en el espacio extracelular, el ATP activa P2XR (canales iónicos activados por ligando), receptores P2YR (pertenecientes a la superfamilia GPCR) y puede ser hidrolizado por ectonucleotidasas (aquí, CD39 y CD73 se ilustran por su relevancia en el cáncer) para formar ADP, AMP y adenosina (ADO). ADP es capaz de activar P2Y12R y ADO activa a GPCR de la familia P1 denominada (A1R, A2AR, A2BR y A3R). La ADO es hidrolizada por la adenosina desaminasa (ADA) a inosina o es transportada a la célula por transportadores de nucleósidos (NT) (Campos-Contreras, et al., 2020).

Los receptores P2X son canales catiónicos activados por ligando permeables a Na^+ , K^+ y Ca^{2+} y su ligando natural es el ATP. Se han clonado y caracterizado siete subunidades de estos receptores, P2X₁-P2X₇, pero los receptores funcionales son trímeros, en algunos casos homotrímeros o combinaciones de 2 subunidades, siendo la principal diferencia entre estos receptores su sensibilidad a los agonistas y, por lo tanto, sus tasas de activación y desensibilización, así como sus características farmacológicas (Coddou et al., 2011; Martínez-Ramírez & Vázquez-Cuevas, 2015).

La diversidad de los receptores P2X se determina mediante el ensamblaje de subunidades individuales; hasta ahora se han identificado seis homoméricos (P2X₁–P2X₅ y P2X₇; en cuanto al receptor P2X₆ las subunidades aparentemente no se oligomerizan) y se han identificado seis canales heteroméricos (P2X_{1/2}, P2X_{1/4}, P2X_{1/5}, P2X_{2/3}, P2X_{2/6} y P2X_{4/6}). Los receptores homoméricos P2X₇ se activan a concentraciones de 100–1000 μM de ATP, mientras que el resto de los receptores tienen una EC₅₀ de ~ 1 –10 μM (Abbracchio et al., 2009). Todos los receptores P2X son permeables al Ca²⁺; la relación de permeabilidad de Ca²⁺ respecto a otros cationes monovalentes varía entre 1 y mayor a 5–10 para varias combinaciones de subunidades P2X. Finalmente, la participación del poro de P2X₇ en la inducción de apoptosis a través de la entrada sostenida de Ca²⁺ en las células se ha sugerido repetidamente (Abbracchio et al., 2009).

En cuanto a los receptores P2Y, estos son GPCR, se han descrito ocho subtipos en mamíferos, y fueron nombrados cronológicamente a medida que fueron clonados, P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄; los números que faltan corresponden a los ortólogos de receptores que no se han encontrado en mamíferos o que comparten características funcionales y moleculares con los receptores P2Y, pero que no se ha demostrado que sean activados por nucleótidos (Tabla 1) (Martínez-Ramírez & Vázquez-Cuevas, 2015).

De los 8 subtipos, cada uno presenta diferente preferencia por una proteína G: P2Y₁, ₂, ₄ y ₆ interactúan con G $\alpha_q/11$, P2Y₁₁ con G $\alpha_q/11$ o G α_s y P2Y₁₂, ₁₃ y ₁₄ se unen a G α_i . Los receptores P2Y acoplados a G α_q promueven la señalización a través de fosfoinosítidos, liberando Ca²⁺ del retículo endoplásmico a través de la generación de IP₃, mientras que los acoplados a G α_i inhiben al adenilato ciclasa y modulan una gran cantidad de proteínas efectoras, por ejemplo, a los canales rectificadores entrantes de K⁺, así como canales de Na⁺ y Ca²⁺, las MAPKs, y cinasas como la PKC o la PI3K (von Kügelgen, 2006). En algunas circunstancias, los receptores P2Y (por ejemplo, P2Y₂) pueden interactuar directamente con otras proteínas (por ejemplo, integrinas) sin mediación de una proteína G (Abbracchio et al., 2009).

Por otro lado, se ha demostrado que el UTP también puede ser liberado al espacio extracelular en respuesta a estímulos similares a los que promueven la liberación de ATP. Además, se sabe que las ectonucleotidasas de las familias ENTPD y ENPP pueden degradar nucleótidos de

uridina y llevar a la formación de UDP y fosfato inorgánico (De Ita et al., 2016;). El UTP es un ligando fisiológico de los receptores P2Y₂ y P2Y₄, y el UDP del receptor P2Y₆ (von Kügelgen, 2006).

Tabla 1. Receptores P2Y que han sido clonados y la potencia de sus principales agonistas, así como sus mecanismos de transducción (Modificado de Burnstock, 2007).

| Receptor | Potencia de agonistas | Mecanismos de transducción |
|-------------------|---|--|
| P2Y ₁ | 2MeSADP>ADP* >ATPγS>2MeSATP>ADPβS >ATP* | Gq/G11; activación de PLC-β |
| P2Y ₂ | UTP* >ATP* >5BrUTP>Up4U | Gq/G11 y posiblemente Gi/Go; activación de PLC-β |
| P2Y ₄ | UTP* >ITP>ATP* | Gq/G11 y posiblemente Gi; activación de PLC-β |
| P2Y ₆ | UDP* >5BrUTP>UTP* >ADP* >2-MeSATP | Gq/G11; activación de PLC-β |
| P2Y ₁₁ | ATPγS>BzATP>dATP>ATP* >ADPβS>2-MeSATP | Gq/G11 y Gs; activación de PLC-β |
| P2Y ₁₂ | 2MeSATP=2MeSADP>ADP* >ATPγS>ADPβS>2CIATP | Gai; inhibición de adenilato ciclasa |
| P2Y ₁₃ | ADPβS=2MeSADP=2MeSATP>ADP* >Ap3A>ATP* >IDP | Gi/Go |
| P2Y ₁₄ | UTP glucosa* >UDP-galactosa* >UDP ácido glucurónico* > UDP-N-acetilglucosamina* | Gi/Go |

*ligandos endógenos.

CÁNCER DE OVARIO

El término COv se usa a menudo para hacer referencia a cualquier tumor de ovario maligno primario, sin embargo, esta forma de emplearlo resulta inadecuada debido a que no es una sola enfermedad, si no un conjunto de neoplasias con características y pronósticos clínico-

patológicos y moleculares distintos que involucran al ovario (National Academies of Sciences, 2016).

A pesar de los enormes esfuerzos que se han realizado para caracterizar los tipos de neoplasias de COv e identificar vías tumorales y biomarcadores para potenciales estrategias terapéuticas, la heterogeneidad tumoral que se ha reportado entre estos e incluso dentro de un mismo tumor es muy alta, lo que representa una de las principales causas de fracaso del tratamiento (Kossai, et al. 2018).

Su clasificación resulta complicada debido a evidencia que sugiere que muchos carcinomas de ovario no surgen en el ovario per se (Figura 2). Cada vez hay más pruebas que respaldan el concepto de que los COv pueden derivarse de múltiples sitios, incluido el epitelio de la superficie del ovario, las células epiteliales de la superficie atrapadas en quistes de inclusión dentro del estroma ovárico, la porción distal de la trompa de Falopio o una lesión en el endometrio (Al-Alem, et al. 2019).

Los cánceres de ovario con diferenciación epitelial (carcinomas) representan más del 90% de los cánceres de este órgano y son responsables de la mayoría de las muertes relacionadas con el COv. Además, los carcinomas epiteliales ováricos (CEO) por sí mismos representan un grupo diverso de malignidades, ya que expresan una amplia gama de morfologías histológicas, manifestaciones clínicas y, consecuentemente, alteraciones genéticas (Karst & Drapkin, 2010), por lo que el estudio del epitelio superficial ovárico es de gran importancia para comprender su etiología (Auersperg et al., 2001).

La Organización Mundial de la Salud clasifica los CEO en varias categorías morfológicas: carcinomas serosos, carcinomas mucinosos, carcinomas endometrioides y carcinomas de células claras. Estos subtipos son distintos en etiología, morfología, biología molecular y pronóstico, pero se tratan como una sola entidad (Kossai, et al. 2018).

Recientemente se ha propuesto un modelo dualista para subclasificar los CEO en 2 grupos, tipo I y tipo II, que se propone, progresan a lo largo de 2 vías tumorígenas diferentes, partiendo de datos moleculares que se integraron con características clínico-patológicas (Kurman & Shih, 2011).

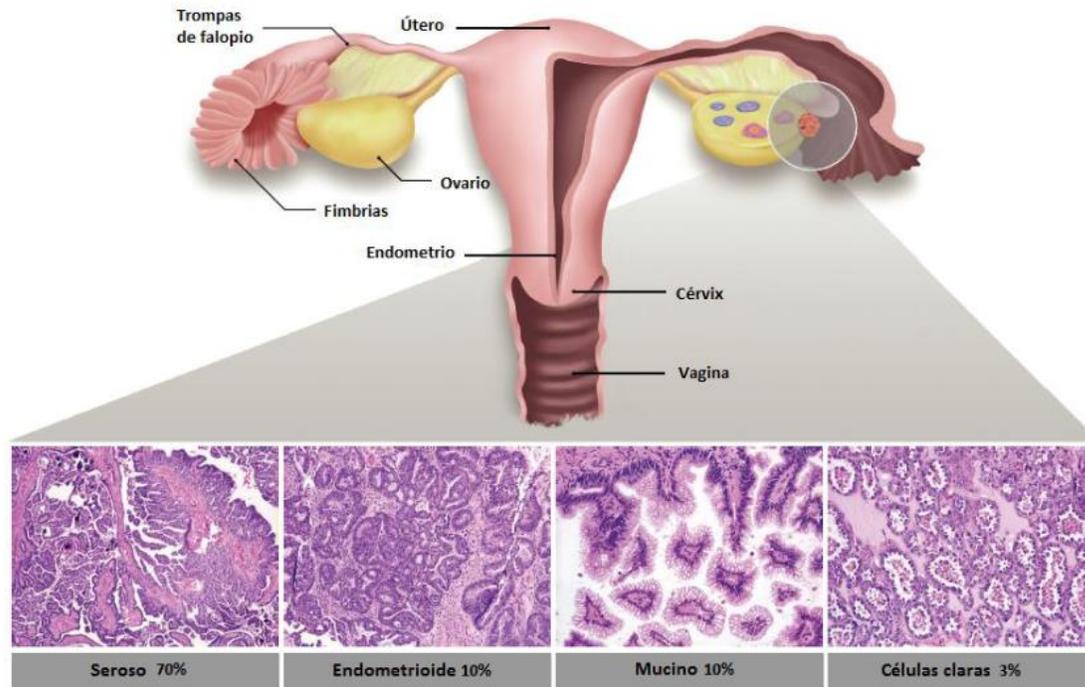


Figura 2. Subtipos de carcinomas ováricos.

Representación del tracto reproductor femenino y secciones tumorales de los cuatro subtipos más comunes de carcinomas ováricos teñidos con hematoxilina-eosina: seroso, endometriode, mucino y de células claras (Modificada de Karst and Drapkin 2010).

Los CEO de tipo I incluyen carcinomas serosos de bajo grado, carcinomas endometrioides de bajo grado, carcinomas mucinosos y carcinomas de células claras (figura 2). Los cuales presentan mutaciones somáticas de los genes que codifican para las proteínas *KRAS*, *BRAF* o *ERBB2*, carecen de mutaciones en *TP53* y se cree que surgen en un proceso escalonado a partir de lesiones neoplásicas limítrofes (Kurman & Shih, 2011).

Los CEO de tipo II incluyen carcinomas serosos de alto grado, carcinoma indiferenciado y carcinosarcoma. Estos tumores muestran mutaciones frecuentes en oncogenes específicos, incluida una mutación patognomónica de *TP53*. Se diagnostican en una etapa avanzada, tienen un comportamiento agresivo y se diseminan rápidamente (Kurman & Shih, 2011). Dentro de esta clasificación, más del 70% de los carcinomas de ovario son carcinomas serosos de alto grado (National Academies of Sciences, 2016).

Sin embargo, este sistema de 2 niveles parece estar muy simplificado, ya que se agrupan tumores que no están relacionados morfológica o genéticamente. Incluso a nivel clínico, es importante señalar que los tumores de tipo I diagnosticados en una etapa tardía tienen un pronóstico precario como los tumores de tipo II (Kossaï, et al. 2018).

Como ya se mencionó anteriormente, el tratamiento estándar para los Cov es la intervención quirúrgica citorreductora, seguida de la quimioterapia a base de platino (Cortez, et al. 2018). La citorreducción óptima se define como la cirugía que extrae la mayor cantidad de tumores posibles, permitiendo que los nódulos tumorales residuales sean menores a 1 cm en su diámetro. No obstante, un análisis multivariado mostró una mejor supervivencia para pacientes con resección completa en comparación con los grupos con la llamada citorreducción óptima. Por lo tanto, el objetivo de la cirugía de primera línea es lograr la resección completa de los residuos macroscópicos de la enfermedad (citorreducción completa). Sin embargo, en estadios avanzados (III / IV), la citorreducción completa a menudo no es posible, la razón más común es la convulsión del mesenterio del intestino delgado y las lesiones en el hilio hepático (du Bois, et al. 2009).

Continuando con el tratamiento posterior a la cirugía, los pacientes son tratados con platino por vía intravenosa, cada 21 días, durante seis ciclos (quimioterapia de primera línea). Los pacientes con lesiones inoperables o debido a un estado funcional deficiente se tratan primero con quimioterapia de inducción (neoadyuvante), después de tres ciclos de esta, si hay una respuesta al tratamiento, se puede realizar la cirugía citorreductora y posteriormente se continúa con la quimioterapia, hasta seis ciclos (Cortez, et al. 2018).

En cuanto a la alta tasa de pacientes que desarrollan recidivas, la principal opción para el tratamiento del cáncer de ovario recurrente es la quimioterapia. Un factor importante, es el tiempo transcurrido desde el final del tratamiento anterior, información que se utiliza como determinante de la sensibilidad del tumor al platino y permite clasificar a los tumores como: refractario al platino, cuando el tumor progresa durante el tratamiento de primera línea; resistente al platino, cuando la recurrencia es dentro de los 6 meses posteriores a la finalización del tratamiento de primera línea; parcialmente sensible, cuando la recurrencia es entre los 6 a

12 meses; muy sensible, cuando la recurrencia es después de más de 12 meses (Cortez, et al. 2018).

Los principales fármacos que contienen platino son: cisplatino, carboplatino y oxaliplatino. La acción principal de estos fármacos es su unión con el ADN en el núcleo celular a través de enlaces entre cadenas e intracadenas, y enlaces entre proteínas y ADN, de manera que inhiben mecanismos de transcripción y / o replicación del ADN, y evitan la división y el crecimiento celular, lo que posteriormente desencadena procesos citotóxicos que conducen a la apoptosis de las células cancerosas (Cepeda, 2007).

Como se mencionó en la introducción, los cánceres de ovario se caracterizan por su alta letalidad, tienen la mayor tasa de mortalidad entre los cánceres ginecológicos a nivel mundial. Esto, entre otros factores se debe a que la mayoría de los pacientes desarrollan una enfermedad recurrente resistente al platino (Al-Alem, et al. 2019).

Se han estudiado diversas explicaciones para la resistencia a la terapéutica, alteraciones genéticas y epigenéticas, inactivación de los citotóxicos y la implicación de células de cáncer con características de troncalidad. Dentro de la evidencia encontrada, se sabe que, en respuesta al estrés generado por la radioterapia y la quimioterapia, algunas células con estas características de troncalidad sobreviven, son seleccionadas y se van acumulando, presentando nuevas mutaciones, lo que lleva a una mayor diversidad genética y heterogeneidad tumoral (Ottevanger, 2017).

Modelo estocástico vs Modelo jerárquico

El enfoque tradicional del tratamiento contra el cáncer ha sido el atacar a todas las células cancerosas por igual para lograr una "cura". Esta propuesta se basa en el modelo de evolución estocástica o clonal, que postula que las células individuales transformadas adquieren una capacidad proliferativa ilimitada, así como la capacidad de autorrenovarse e impulsar el crecimiento tumoral. Durante el desarrollo temprano del tumor, una o pocas células se transforman, produciendo un crecimiento descontrolado con una acumulación evolutiva resultante de diferentes mutaciones. Estas células mutantes impulsan el crecimiento del tumor y dan como resultado subpoblaciones heterogéneas dentro del tumor (Rahman, et al., 2011).

Es importante destacar que el modelo estocástico propone que, durante la vida del tumor, cualquiera de las células cancerosas puede participar en su crecimiento o desarrollar resistencia y provocar la recurrencia. Por tanto, todas las células se consideran tumorigénicas y, por tanto, son objetivos de tratamiento. Este enfoque ha formado la columna vertebral de una gran cantidad de estudios diseñados para eliminar la carga tumoral. Sin embargo, para la mayoría de los cánceres de tejido sólido, rara vez se obtienen curas y las tasas de mortalidad han cambiado muy poco en los últimos 60 años (Rahman, et al., 2011).

En las últimas décadas esta teoría ha sido cuestionada por el modelo jerárquico; el cual, similar al modelo estocástico propone que las células mutadas individuales obtienen un potencial proliferativo ilimitado y la capacidad de generar tumores, con la diferencia de que las células con esta capacidad proliferativa que impulsa el crecimiento tumoral son una subpoblación pequeña y con cualidades de células troncales. En contraste con el modelo estocástico, la naturaleza multipotente de estas células resulta en la heterogeneidad dentro de un tumor como consecuencia de una diferenciación aberrante y cambios epigenéticos de la progenie. La mayoría de las células (progenie) no contribuyen al crecimiento tumoral, no pueden formar tumores secundarios y tienen las mismas anomalías genéticas de la célula jerárquica de la que se originaron. Esta rara población de células con características troncales es responsable del crecimiento, la recurrencia y la resistencia del tumor, lo que implica que la eliminación indiscriminada de todas las células cancerosas puede ser un método ineficaz para tratar el cáncer porque no puede apuntar o eliminar a la subpoblación con características troncales que es responsable del crecimiento tumoral. El desarrollo de un nuevo enfoque para tratar una enfermedad que a menudo tiene pocas opciones ha redirigido la investigación en cuanto al cáncer (Rahman, et al., 2011).

CÉLULAS INICIADORAS DE TUMORES

Las CIT, como las hemos denominado en el presente trabajo, son células que presentan características troncales, las cuales además se ha propuesto les confiere la capacidad de iniciar el crecimiento tumoral, así como el tener un papel fundamental en el desarrollo y perpetuación en diferentes formas de cáncer humano (Jordan et al., 2006; Rahman, et al., 2011).

Entre las características que comparten las células troncales normales (CTN) con las CIT están las vías de señalización por las que son reguladas , (Wnt, Hedgehog, Notch, entre otras), de igual manera tienen una incrementada capacidad de detoxificación (Moitra, 2015; O'Brien et al., 2009) al sobre-expresar algunos transportadores de drogas (Hedditch et al., 2014) y una exacerbación de los mecanismos de reparación del DNA (Wang, 2015), lo que les permite tener resistencia a drogas quimioterapéuticas. Además, estos dos tipos de células comparten su capacidad de división asimétrica, expresión de marcadores de superficie e inducción a la metástasis (Al-Alem et al, 2019).

Por el contrario, existen diferencias que distinguen a las CIT de las CTN. Por ejemplo, las CTN se caracterizan por el equilibrio homeostático altamente regulado de la autorrenovación, mientras que las CIT no tienen esta capacidad (Shackleton, 2010). Además, las CIT muestran una lenta tasa de recambio, lo que las hace insensibles a las estrategias citotóxicas actuales diseñadas para apuntar a las células tumorales en masa que se replican más rápidamente (Moitra, 2015). Como mencionábamos anteriormente, se cree que la diferenciación de las CIT es jerárquica, lo que permite que los subconjuntos de células tengan diferentes niveles de capacidad de replicación, a menudo denominados células progenitoras transitorias (Al-Alem et al, 2019).

Se ha mostrado que, en respuesta al estrés iniciado por la cirugía, el tratamiento farmacológico y el microambiente tumoral, algunas CIT pueden sufrir una mayor selección o acumulación de mutaciones genéticas que conducen a grupos tumorales más heterogéneos y genéticamente diversos (Al-Alem et al, 2019).

El concepto de CIT o células troncales de cáncer existe desde hace más de un siglo, pero solo emergió a la vanguardia de la investigación del cáncer con la identificación de marcadores moleculares relacionados con la condición de troncalidad. Entre los marcadores que se han identificado, se encuentran CD44, CD117, CD133, CD24 y la actividad de ALDH (Al-Alem et al, 2019).

Uno de los biomarcadores más comúnmente identificados en las CIT es CD133 (prominina-1), el cual es una glicoproteína transmembranal con un papel importante en la organización de la membrana celular, que ha sido usado en la identificación de células troncales de tumores sólidos,

incluyendo el cáncer ovárico (Ferrandina et al, 2008). Las células CD133⁺ son altamente tumorigénicas y presentan resistencia a quimioterapéuticos, encontrándose esta población celular enriquecida en pacientes resistentes a platino, lo que sugiere su papel en la resistencia terapéutica (Al-Alem et al, 2019).

En líneas celulares de COv, bajo condiciones de hipoxia inducida por CoCl₂, se han generado agregados celulares (esferoides) que presentan marcadores de troncalidad, como CD133, con una elevada capacidad de generar tumores en xenotransplantes (Zhang et al, 2014). La formación de esferoides que presentan marcadores de troncalidad se ha logrado también mediante el crecimiento en condiciones no adherentes a partir de líneas celulares de COv (Luo et al, 2013), y se han propuesto como un modelo importante para estudiar la biología del tumor.

En el 2005 Bapat y colaboradores caracterizaron las propiedades de células troncales o progenitoras de COv utilizando células aisladas de pacientes con ascitis. Usando una combinación de aislamiento clonal, crecimiento independiente del anclaje y técnicas de formación de esferoides, identificaron células que poseían propiedades similares a las CTN. Si bien no todas las células tumorales tienen la capacidad de formar nuevos tumores, estas células troncales ováricas eran tumorigénicas (Bapat et al., 2005).

Por otro lado, Steg y colaboradores analizaron muestras de tumores recurrentes obtenidas tres meses después de la finalización del tratamiento primario, en las que encontraron un enriquecimiento de las CIT y de los indicadores de troncalidad (Steg et al., 2012). La evidencia funcional limitada sugiere que el tratamiento de líneas celulares de COv o tumores ováricos in vivo con cisplatino u otros citotóxicos puede inducir a las células a tomar una o más propiedades similares a las CIT (es decir, quimio-resistencia) o causar el enriquecimiento de las CIT (Chaffer et al., 2011; Chaffer y Weinberg, 2011).

Recientemente, se ha retomado un concepto relativamente nuevo en el campo de la investigación de las CIT descrito como “plasticidad de CIT”, el cual ha traído controversia adicional a un campo ya controvertido. La plasticidad de las células se refiere a la capacidad de una población específica de células para cambiar entre diferentes estados fenotípicos; un estado más diferenciado a un fenotipo de CIT. La interconversión bidireccional entre troncalidad y no troncalidad se atribuye a cambios genéticos, epigenéticos, farmacológicos y

microambientales (van Neerven et al., 2016). Este proceso supuestamente combina elementos del modelo de evolución clonal y el modelo de CIT jerárquico (Kreso y Dick, 2014; Rich, 2016).

Por lo que, actualmente sigue siendo un punto de debate en la comunidad científica, qué modelo es el principal responsable de la tumorigénesis, la metástasis y la enfermedad recurrente (Al-Alem et al, 2019).

CÉLULAS CANCERÍGENAS GIGANTES POLIPLÓIDES

Como se mencionó anteriormente, los tumores presentan heterogeneidad en su composición y entre sus muchas características histopatológicas se ha identificado la presencia de grandes células cancerosas atípicas con múltiples copias de ADN, a las que algunos autores las han denominado células cancerosas gigantes poliploides (CCGP). A menudo se ha pensado que las CCGP se originan a partir de fallas repetidas de mitosis o como productos intermedios de inestabilidad genómica, lo cual resulta característico del cáncer (Zhang et al, 2014).

Investigaciones previas han reportado que la cantidad de las CCGP varía en el ambiente tumoral de los diferentes tipos de cáncer, encontrando una mayor cantidad de este tipo de células en grados patológicos altos y en estadios tardíos de la enfermedad o después de la quimioterapia. Una de estas investigaciones es la realizada por Malpica y colaboradores en el 2004, en la que evaluaron un sistema de clasificación del carcinoma de ovario seroso, el cual se basó en el estudio de la atipia nuclear y en la tasa mitótica utilizada como característica secundaria de las células del carcinoma. En este estudio se encontró que los casos asignados a la categoría de bajo grado se caracterizaron por la presencia de atipia nuclear leve a moderada y como característica secundaria, tendían a mostrar hasta 12 mitosis por 10 campos de alta potencia; por otro lado, aquellos en la categoría de alto grado tenían una marcada atipia nuclear y como característica secundaria más de 12 mitosis por 10 campos de alta potencia. Con lo que los autores concluyeron, que las características nucleares de las CCGP permitieron predecir el pronóstico del cáncer en los pacientes participantes (Malpica, et al. 2004).

Por otro lado, Zhang y colaboradores observaron que en las más de diez líneas celulares de carcinoma que estudiaron, las CCGP mostraron dos características morfológicas en común, su gran tamaño y su núcleo gigante; por lo general, las CCGP eran de 3 a 10 veces más grandes que las células cancerosas normales. Además, propusieron que las CCGP representan una

forma inactiva de células cancerosas, las cuales son inducidas al ciclo celular debido al estrés y de esta manera generan células troncales cancerígenas que contribuyen activamente al crecimiento del tumor (Zhang et al, 2014).

Esta propuesta deriva de los experimentos realizados por este equipo de trabajo, en los que generaron esferoides tumorales a partir de cultivos de CCGP en medio para células troncales y matrigel; estos esferoides eran positivos para la expresión de CD44, CD133, OCT3/4, Nanog, SOX-2 y ABCG2, lo que sugiere que al menos parte de las células dentro de estos esferoides pueden haber adquirido propiedades de troncalidad. Además, determinaron la tumorigenicidad de las CCGP in vivo, inyectando subcutáneamente un esferoide en ratones desnudos, lo que llevo a la formación de tumores. El examen histológico mostró que las células tumorales resultantes tenían una mayor proporción de núcleo a citoplasma, mostraban una morfología mesenquimal, tenían menor expresión de citoqueratina y mayor expresión de vimentina que las células tumorales control (Zhang et al, 2014).

Uno de los modelos experimentales in vitro que se han empleado para la generación y el estudio de células CCGP, ha sido el uso del cloruro de cobalto (CoCl_2), el cual funciona como un imitador de hipoxia (deficit de oxígeno) en el cultivo celular, ya que puede activar las vías de señalización mediadas por esta. Actualmente se sabe que la hipoxia juega un papel importante en el desarrollo normal de tejidos y tumores; se asocia con la formación y mantenimiento de células troncales cancerosas ya que promueve el fenotipo de troncalidad y la tumorigénesis (Zhang et al, 2014).

Hipoxia

A lo largo de la evolución, las células han generado mecanismos para detectar y desencadenar respuestas a las fluctuaciones en las concentraciones de oxígeno. La disminución en el suministro de oxígeno ($\leq 1\% \text{ O}_2$) por diferentes mecanismos, en un tejido o células, como el transporte inadecuado o la incapacidad de las células para utilizarlo, se conoce como hipoxia (Wheaton & Chandel, 2011).

En el caso de los tumores sólidos, se sabe que contienen regiones poco vascularizadas caracterizadas por hipoxia severa, pH bajo y falta de nutrientes. La hipoxia tumoral se asocia típicamente con un mal pronóstico del paciente, en parte porque los niveles bajos de oxígeno

reducen la eficacia de la radioterapia que destruye las células tumorales al generar especies reactivas de oxígeno (Keith & Simon, 2007).

Durante las últimas décadas, diversas investigaciones han indicado que los microambientes hipóxicos contribuyen a la progresión del cáncer al activar programas transcripcionales adaptativos que promueven la supervivencia celular, la motilidad y la angiogénesis tumoral. Incluso, se han reportado conexiones moleculares entre factores de transcripción regulados por oxígeno y vías conocidas que regulan la función de células troncales, las cuales sugieren un nuevo mecanismo por el cual los factores de transcripción inducidos por hipoxia pueden impulsar el crecimiento tumoral a través de la generación o expansión de CIT o células troncales cancerosas (Keith & Simon, 2007).

El equipo de investigadores liderado por Heddleston (2009), mostró evidencia en células de glioma, donde la hipoxia aumentó la supervivencia de células troncales cancerosas y reprogramó células no troncales cancerosas hacia un fenotipo de células troncales. En dicho trabajo, los autores reportaron que HIF-1 α se expresó en todas las células neoplásicas y progenitores neurales normales, mientras que HIF-2 α se expresó específicamente en células troncales cancerosas.

Los factores de transcripción principalmente responsables de los cambios causados por la hipoxia son los factores inducidos por hipoxia (HIF). Los HIF son miembros de la familia de proteínas bHLH-PAS y se unen a secuencias de ADN canónicas (elementos regulados por hipoxia, o HRE) en los promotores o potenciadores de genes diana. Consisten en una subunidad α (HIF- α) y una β (HIF- β o ARNT) y activan la expresión de al menos 150 genes que codifican proteínas que regulan el metabolismo celular, la supervivencia, la motilidad, la integridad de la membrana basal, la angiogénesis, la hematopoyesis, y otras funciones (Keith & Simon, 2007) (Figura 3).

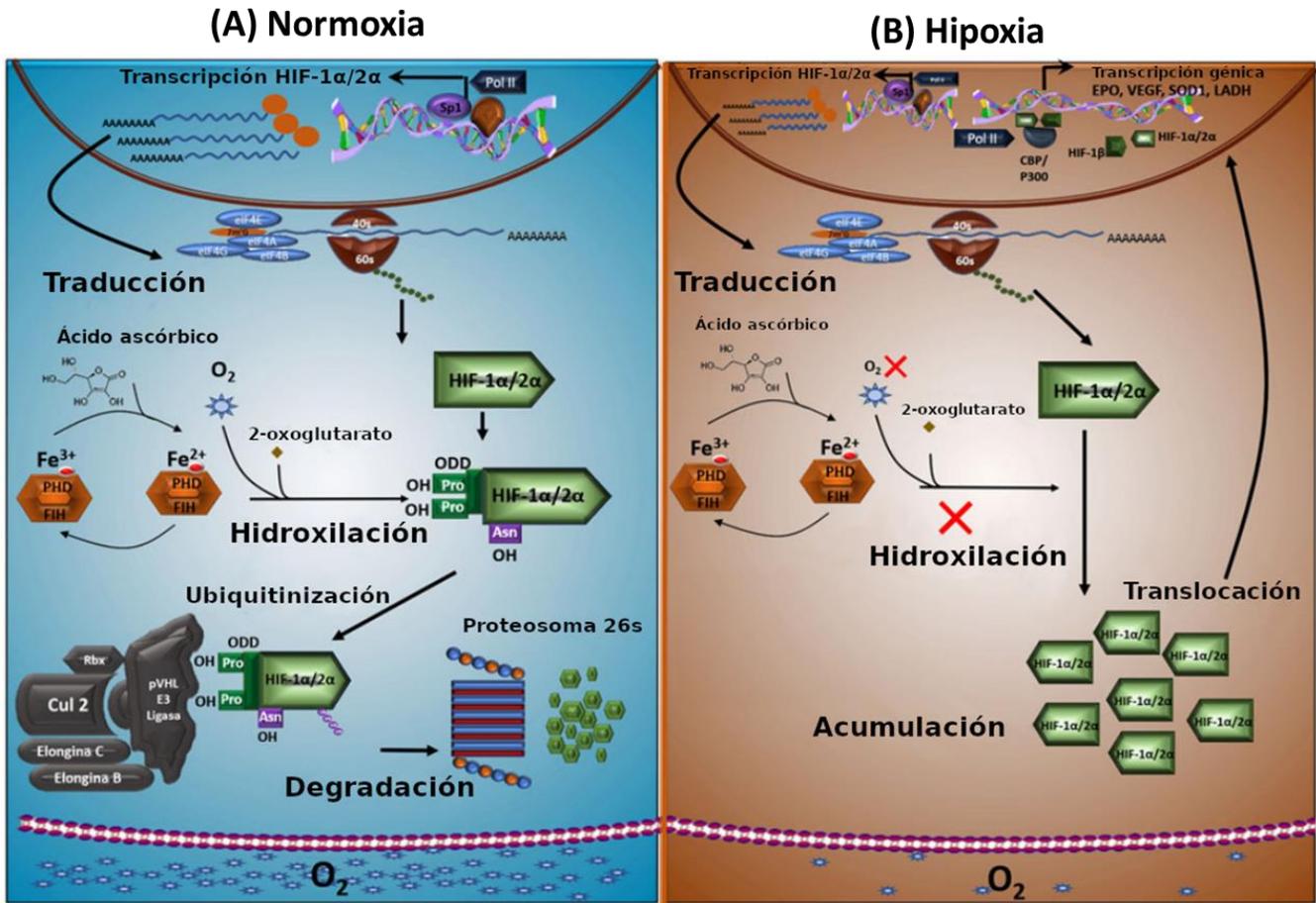


Figura 3. Mecanismo celular regulador dependiente de oxígeno.

A. En condiciones normóxicas, los genes *HIF-1α* y *2α* se transcriben en el núcleo con la ayuda de la proteína de especificidad Sp1. Una vez traducidas en el citoplasma, las proteínas HIF-1α y 2α son hidroxiladas, ubiquitinadas y degradadas por el proteasoma. La hidroxilación dependiente de O₂ de los residuos de prolina 402 y 564 para HIF-1α, y de 405 y 531 para HIF-2α por las enzimas proil hidroxilasas (PHD) es necesaria para la unión de la proteína supresora de tumores VHL, el componente de reconocimiento de una ligasa de ubiquitina-proteína E3. La ubiquitinación de HIF-1α y 2α se lleva a cabo por la proteína para la degradación por el proteasoma 26S. La hidroxilación dependiente de O₂ del residuo de asparagina 803 en HIF-1α por la enzima FIH - 1 bloquea la unión de p300 y CBP a HIF-1α y 2α inhibiendo la transcripción génica mediada por *HIF-1/2*. B. En condiciones hipóxicas, el gen *HIF-1α* y *2α* se transcribe en el núcleo y se traduce en el citoplasma, pero la tasa de hidroxilación de asparagina y prolina disminuye. La proteína supresora de tumores de VHL no puede unirse a HIF - 1α y 2α que no estén proilhidroxilados, lo que da como resultado una menor tasa de degradación y acumulación de HIF-1α y 2α. Por el contrario, p300 y CBP pueden unirse a HIF-1α y 2α que no es asparaginil-hidroxilado, lo que permite la activación transcripcional de los genes diana de *HIF-1/2*. (Muñoz-Sánchez & Chánez-Cárdenas, 2019)

La regulación de la actividad de HIF está mediada principalmente por la estabilidad de la subunidad α : en condiciones de abundante oxígeno (> 8% -10%), las proteínas HIF- α se traducen, pero también se degradan rápidamente. La degradación de HIF- α se desencadena por la hidroxilación de dos residuos de prolina en su dominio de degradación dependiente de oxígeno altamente conservado (Pouysségur, et al., 2006). Estos eventos de hidroxilación son necesarios y suficientes para unirse a la proteína supresora de tumores de Von Hippel-Lindau (VHL), el componente de reconocimiento de una ubiquitina ligasa E3 que dirige los HIF al proteasoma 26S para su destrucción. A medida que los niveles de oxígeno disminuyen por debajo del 8% -10%, las proteínas HIF- α se estabilizan cada vez más, aunque la naturaleza de los mecanismos de detección de oxígeno que regulan estos eventos sigue siendo controvertida. Una vez estabilizadas, las proteínas HIF- α se unen a subunidades ARNT (HIF- β) expresadas constitutivamente en el núcleo, se unen al ADN y activan la transcripción (Pouysségur, et al., 2006; Figura 2).

La desorganización del sistema vascular en los tumores sólidos produce regiones de hipoxia o anoxia severas que colindan con áreas bien oxigenadas. Se cree que la estabilización de las proteínas HIF en células cancerosas hipóxicas promueve la progresión tumoral, en gran parte al inducir la expresión localizada de genes diana específicos que codifican el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), enzimas glucolíticas (PGK, ALDA), transportadores de glucosa (GLUT1), proteínas reguladoras de la motilidad (lisil oxidasa) y metástasis (CXCR4, E-cadherina), entre otras (Keith & Simon, 2007).

CoCl₂ como un modelo experimental

El uso de modelos de hipoxia en cultivo celular ha permitido caracterizar la respuesta de hipoxia a nivel celular, bioquímico y molecular. Aunque una disminución en la concentración de oxígeno es el modelo de hipoxia óptimo, el problema al que se enfrentan muchos investigadores es el acceso a una cámara de hipoxia o una incubadora de CO₂ con niveles de oxígeno regulados, lo que no es posible en muchos laboratorios. En sustitución a este método, se han desarrollado diferentes modelos para la inducción de hipoxia en cultivos celulares, uno de los más utilizados es la hipoxia química inducida por CoCl₂, modelo que permite estabilizar los HIF-1 α y 2 α en condiciones normóxicas (Muñoz - Sánchez & Chánez - Cárdenas, 2019).

En comparación con la hipoxia inducida por bajo nivel de oxígeno y el uso de otros imitadores de hipoxia, el modelo de CoCl_2 mantiene la estabilización de HIF-1 α y HIF-2 α durante varias horas, incluso después de retirar el medio con CoCl_2 ; además, se ha reportado un mejor efecto de este modelo evitando la rápida degradación de estos factores en comparación con otros modelos químicos. Es por ello que el modelo de CoCl_2 permite a los usuarios una ventana de tiempo más amplia para manipular y analizar sus muestras en condiciones normóxicas (Borcar et al., 2013).

De manera general, se ha aceptado que el modelo de CoCl_2 se basa en la inhibición de las proliil hidroxilasas (PHD), enzimas encargadas de la degradación de HIF por medio de hidroxilaciones que llevan a cabo en condiciones normóxicas. La inhibición de estas enzimas ocurre por medio de la sustitución de Fe^{2+} por el Co^{2+} , lo que resulta en el aumento de los niveles de la proteína HIF-1 α e induciendo su actividad transcripcional. Es importante considerar que el Co^{2+} tiene diferentes características redox a las del Fe^{2+} porque sus estados redox (2^+ y 3^+) dependen del compuesto ligando, el pH y el potencial redox estándar, por lo que es probable que estas condiciones sean importantes para la reacción catalítica de las PHD (Muñoz-Sánchez & Cháñez-Cárdenas, 2019).

Otro posible mecanismo que podría estar involucrado en la estabilización de la proteína HIF-1 α y su actividad transcripcional mediada por CoCl_2 es el inhibidor de HIF-1 α (FIH-1) y la proteína acetiltransferasa ARD1. Se sabe que el CoCl_2 regula negativamente la transcripción de FIH y ARD-1 (Ke, Kluz y Costa, [50]). La acetilación mediada por ARD - 1 en la lisina 532 de HIF-1 α mejora la unión de HIF-1 α con pVHL (Jeong et al., [42]), esta acetilación es fundamental para la degradación proteasomal. La regulación a la baja de FIH-1 y ARD-1 conduce a un aumento en HIF-1 α y su actividad de transcripción (Muñoz-Sánchez & Cháñez-Cárdenas, 2019).

Actualmente, existe una cantidad sustancial de información sobre cómo funciona este modelo, sin embargo, no se ha logrado esclarecer y llegar a un consenso de todos los mecanismos que participan en el. A pesar de ello, el CoCl_2 ofrece diversas ventajas a los experimentadores y una inducción efectiva a la hipoxia, lo que lo muestra como un modelo experimental confiable de hipoxia en cultivos celulares (Muñoz-Sánchez & Cháñez-Cárdenas, 2019).

SISTEMA PURINÉRGICO EN EL CÁNCER

Cuando el organismo se encuentra en un estado patológico de cáncer, las células cancerosas presentan desregulación metabólica, lo que lleva a un aumento en la producción de ATP y de su principal metabolito adenosina (Warburg, 1956; Teicher et al., 2012). Este incremento de ATP y adenosina se observa de manera particular en el microambiente tumoral (MAT), lo cual se documentó en el 2008, cuando Pellegatti y colaboradores desarrollaron una sonda codificada genéticamente (luciferasa de membrana plasmática) que permitió la medición in vivo de la concentración extracelular de ATP, de esta manera se observó que el nivel de ATP en el MAT de tumores sólidos se encontraba en el rango de 100–700 μM , lo que resulta mucho mayor que la concentración habitual de este nucleótido en el intersticio de tejidos sanos que va de 10 a 100 nM (Pellegatti et al., 2008).

Dado que la concentración intracelular de ATP está en el rango de 5 a 10 mM, se genera un gradiente de concentración de ATP dirigido al exterior de al menos cinco órdenes de magnitud. A pesar del alto contenido extracelular de ATP en el MAT, en los tumores está presente un gradiente electroquímico de ATP dirigido al exterior de al menos dos órdenes de magnitud, lo que facilita el flujo pasivo de ATP citoplasmático (Di Virgilio, et al., 2018).

Algunas vías para la liberación de ATP en células cancerígenas son similares a las que presentan células sanas, como los canales maxi-anion, los canales de aniones regulados por volumen y las proteínas de la membrana plasmática que forman poros no selectivos, como las conexinas, los hemicanales de panexina 1 y el propio receptor P2X₇. De estos mecanismos, se cree que la panexina 1 es la vía principal para el flujo de salida de ATP en la mayoría de los tipos de células (Di Virgilio, et al., 2017).

Una fuente importante de ATP para el MAT son las células en proceso de apoptosis, ya que como se sabe una lesión celular causa daño a la membrana plasmática, lo que permite la liberación del nucleótido; este proceso se observa también en respuesta a terapias anticáncer como quimioterapia o radioterapia. Además, la activación de oncogenes, por desregulación de supresores de tumores o por la actividad de HIF tanto en condiciones aeróbicas como en microambientes hipóxicos, incluso en ausencia de una lesión celular, está relacionado con la liberación de ATP; como resultado se promueve la producción de lactato a partir de piruvato,

incrementando la actividad glucolítica y disminuyendo la actividad mitocondrial (Cairns et al., 2011).

En cuanto a la eliminación de ATP en el MAT, se sabe que puede seguir una ruta poco convencional que no termina en la generación de adenosina y, en consecuencia, podría ser más rentable para la energía de las células cancerosas. Algunas líneas celulares de cáncer (por ejemplo, las células humanas A549 de cáncer de pulmón y las líneas celulares MCF7 de carcinoma de mama humano) pueden tomar ATP extracelular por un mecanismo que involucra la macropinocitosis, una forma regulada de endocitosis que media la absorción de líquido extracelular y pequeñas moléculas solubles. Se ha demostrado que el incremento en el contenido intracelular de ATP logrado por esta ruta aumenta la resistencia de las células cancerosas al tratamiento farmacológico quimioterapéutico (Wang, et al., 2017).

Respecto a los receptores purinérgicos, se ha reportado que casi todas las líneas de células tumorales y biopsias de tumores sólidos y hematológicos expresan o sobre expresan la mayoría de los subtipos de receptores P2, un hallazgo a menudo asociado con un mal pronóstico. La estimulación de receptores P2 activa varias vías tróficas intracelulares que sostienen la proliferación celular incluso en ausencia de factores de crecimiento. Entre los receptores P2Y, P2Y₁, P2Y₂ y P2Y₆ impulsan el crecimiento de las células cancerosas al elevar el Ca²⁺ intracelular y activar las vías PI3K-AKT y ERK-MAPK 3 (Burnstock & Di Virgilio, 2013).

En la subfamilia de los receptores P2X, P2X₇ es el subtipo más comúnmente asociado con la promoción de la proliferación celular. La identificación de un efecto promotor del crecimiento por el receptor P2X₇ en células tumorales podría considerarse paradójico debido a que este receptor es mejor conocido por su actividad citotóxica. La cascada de transducción de señal intracelular dependiente de P2X₇ se ha examinado en varios tipos de células, incluida la línea celular humana HEK293, las células de neuroblastoma humano y de melanoma de ratón, con un aumento en los niveles del Ca²⁺ mitocondrial y el factor nuclear de las células T activadas, las vías citoplasmáticas 1 (NFATC1) y PI3K-AKT-glucógeno sintasa quinasa-3β (GSK3β) se identifican como las señales clave que promueven el crecimiento (Amoroso et al. 2015).

La actividad de P2X₇ como canal de Ca²⁺ parece ser central para su función trófica y promotora del crecimiento, ya que esta capacidad es retenida incluso por los receptores P2X₇ formados

por el ensamblaje de la variante P2X_{7B}. La expresión de P2X_{7B} está regulada por incremento en pacientes con osteosarcoma y se correlaciona con una mayor proliferación in vitro de células de osteosarcoma (Giuliani, et al., 2014).

Alternativamente, en la mayoría de los tipos de células cancerosas se encuentra un alto contenido de colesterol en la membrana plasmática, lo que podría inhibir la apertura del receptor P2X₇ y la citotoxicidad resultante, al tiempo que inhibe el flujo de Ca²⁺, el cual promueve el crecimiento. También se ha demostrado un papel proapoptótico en las células cancerosas para otros receptores P2 como P2Y₁ y P2Y₂ (Wan, et al., 2016).

LA SEÑALIZACIÓN PURINÉRGICA Y LA TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA

La EMT (transición epitelio-mesénquima) es un proceso biológico que permite que una célula epitelial polarizada, que normalmente interactúa con la membrana basal a través de su superficie basal, experimente múltiples cambios que le permiten adquirir un fenotipo de célula mesenquimal, lo que implica una mayor capacidad migratoria, invasividad y resistencia elevada a la apoptosis. el establecimiento de la EMT se caracteriza por la degradación de la membrana basal subyacente y la formación de una célula mesenquimal que puede migrar lejos de la capa epitelial en la que se originó (Kalluri & Weinberg, 2009).

Cuando se activa el programa de EMT se induce la síntesis de nuevas fibras de actina, iniciando la adquisición del fenotipo mesenquimal mediante cambios en el arreglo del citoesqueleto, como la expresión de vimentina, una proteína fibrosa que conforma los filamentos intermedios. Estas nuevas fibras de actina se unen a la membrana celular y forman lamelipodios, además las células secretan metaloproteasas que degrada la matriz extracelular, facilitando la migración celular (Lamouille et al., 2014).

Se ha propuesto que la EMT ocurre en 3 modalidades diferentes: 1) la asociada con la morfogénesis, que es una EMT sin propiedades invasivas; 2) la EMT que ocurre en la fibrogénesis, así como en el proceso de curación de heridas y 3) la EMT que ocurre en las células cancerosas y les da a estas un fenotipo metastásico (Zeisberg & Neilson, 2009).

En cuanto al tercer tipo de EMT, se han reportado varios procesos moleculares en su inicio y desarrollo; estos incluyen la activación de factores de transcripción, expresión de proteínas

específicas de la superficie celular, reorganización y expresión de proteínas citoesqueléticas, producción de enzimas que degradan a células mesenquimales secretoras de componentes y cambios en la expresión de microRNAs específicos (Kalluri & Weinberg, 2009).

En muchos carcinomas, se han identificado señales que emanan del estroma asociado al tumor, en particular HGF, EGF, PDGF y TGF- β , parecen ser responsables de la activación funcional de una serie de factores de transcripción inductores de la EMT. Estos factores de transcripción se han clasificado en dos grupos dependiendo si tienen efectos directos o indirectos en la represión de la expresión de E-caderina: Snail, Zeb, E47 y KLF8 lo hacen a través de la unión al promotor de E-caderina; mientras que factores de transcripción como Twist, Goosecoid, E2.2 y FoxC2 reprimen la expresión de manera indirecta (Appert-Collin et al., 2015; Thiery & Sleeman, 2006).

Con respecto a la pérdida de los contactos celulares y de la polaridad que ocurren durante la EMT se sabe que la disminución de la expresión de E-caderina lleva a la pérdida del contacto entre las células del epitelio, la falta de interacción entre E-caderina y β -catenina y la actividad de la vía de Wnt, lleva a que β -catenina se acumule en el núcleo y ejerza efectos transcripcionales reprimiendo la expresión de la propia E-caderina y otras moléculas de adhesión, lo que lleva a la disrupción de las uniones entre las células (Lamouille et al., 2014). Por otro lado, por la disminución en la expresión de E-caderina también se presenta una disminución en los contactos entre las células y la lámina basal, llevando a una pérdida de polaridad apico-basal (Godde et al., 2010).

Estudios en diferentes modelos, incluidos procesos fisiológicos y fisiopatológicos, han demostrado la participación de receptores P2 en la inducción de la migración o el proceso EMT (Li et al., 2013; Lamarca et al., 2014; Martínez-Ramírez et al., 2016; Xie et al., 2014). Martínez-Ramírez, y colaboradores, demostraron que la EMT en células SKOV-3 es inducida por la activación del receptor P2Y₂, a través de una vía de transducción de señales que implica la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Esta observación fue apoyada por el hallazgo de que UTP promovió la expresión del filamento intermedio de vimentina, acción que fue bloqueada por AG1478, un inhibidor de la actividad tirosina quinasa del EGFR (Martínez-Ramírez, et al., 2016; figura 4).

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) activa el EGFR, una familia de receptores de membrana con actividad intrínseca de tirosina quinasa. La evidencia acumulada apoya la idea de que la señalización mediada por EGF - EGFR participa en la progresión y la invasividad de diferentes tipos de carcinoma (Normanno et al., 2006). En las células del carcinoma de ovario, la activación de EGFR induce un fenotipo migratorio que involucra el proceso de EMT (Thiery & Sleeman, 2006); esta es una observación importante porque la EMT es un mecanismo involucrado en la metástasis (Kong et al., 2011).

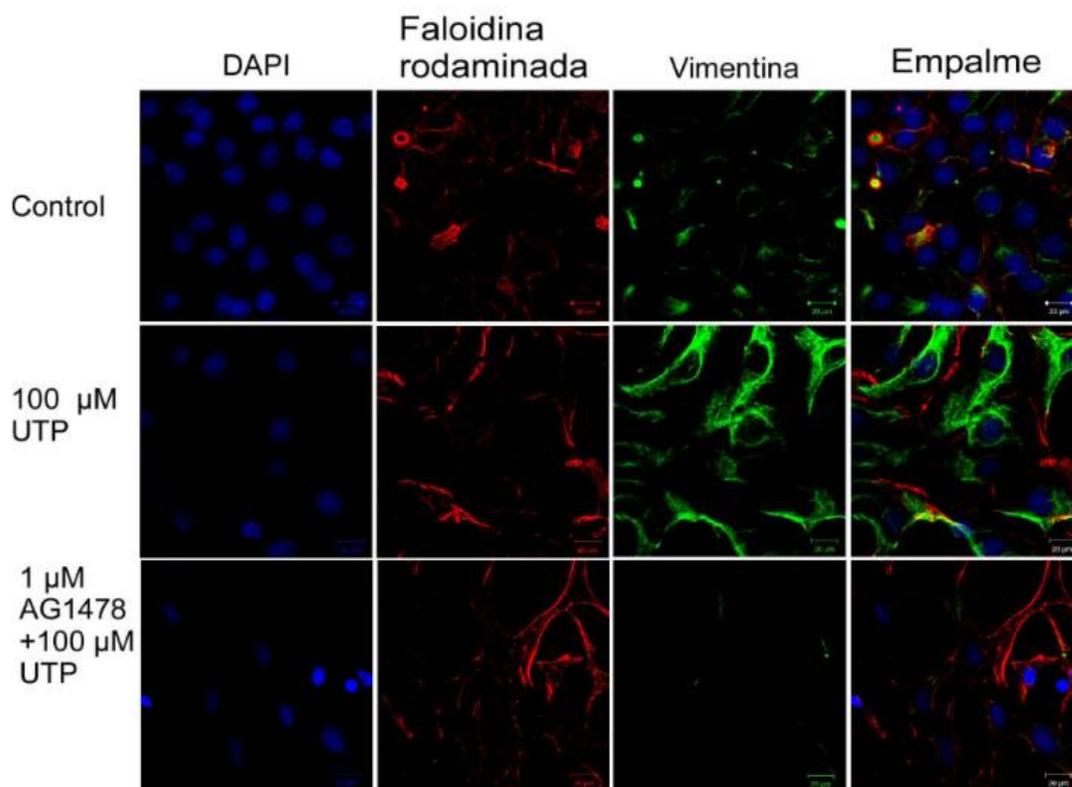


Figura 4. UTP induce incremento en la expresión de vimentina que es inhibido con AG1478.

Marcaje por inmunofluorescencia de la proteína Vimentina en células SKOV-3 incubadas con UTP 100 μM y preincubadas con AG1478 1 μM, en azul se muestra la marca de los núcleos con DAPI, en rojo la marca de los filamentos de actina con faloidina rodaminada y en verde la marca para Vimentina (Mártínez-Ramírez, et al., 2016).

En modelos celulares de cáncer, se ha observado una relación directa entre la selección de células con características troncales y la inducción de la EMT (Chen et al., 2013); por ejemplo, en el 2008, Mani y colaboradores indujeron la EMT en células epiteliales mamarias humanas inmortalizadas no tumorigénicas mediante la expresión ectópica de los factores de transcripción Twist o Snail. Las células resultantes adquirieron apariencias mesenquimales similares a fibroblastos, regularon negativamente la expresión de ARNm que codifican marcadores epiteliales como E-cadherina y regularon positivamente ARNm que codifica para marcadores mesenquimales, como N-cadherina, vimentina y fibronectina. Además, por medio de citometría de flujo clasificaron las células en función de la expresión CD44 y CD24, dos marcadores de superficie celular cuya expresión en la configuración CD44^{alta} / CD24^{baja} se asocia con CIT de cáncer mamario (Mani, et al., 2008). Por tanto, si P2Y2 induce la EMT, puede estar favoreciendo la selección de las células iniciadoras de tumores.

A partir de la información previa, sabemos que las células derivadas de carcinoma ovárico SKOV-3 expresan receptores purinérgicos cuya actividad impacta aspectos funcionales como la proliferación celular, la migración y la inducción de la EMT. Cuando utilizamos una presión de selección como la activación de la vía de hipoxia, el cultivo se enriquece en CCGP, el cual se ha propuesto es un fenotipo con características troncales, relacionado con la resistencia a terapias anticáncer (Zhang et al., 2014).

Actualmente, no hay evidencia en la literatura de la participación de los receptores purinérgicos en CCGP, por lo que el estudiar la respuesta de movilización de Ca²⁺ por receptores purinérgicos acoplados a proteínas Gq, en las células SKOV-3, y después de la presión de selección por hipoxia, en las CCGP, y analizar el cambio en la intensidad y distribución espacial de los receptores nos permitirá conocer acerca de cuáles son las consecuencias de estos cambios en la fisiología celular. Lo que permitirá aportar información para desarrollar nuevos blancos terapéuticos para terapias complementarias que combatan la recidiva tumoral.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer ovárico es el octavo tipo de cáncer más común y la sexta causa de muerte relacionada a cáncer en mujeres a nivel mundial, en el 2018 en México se registró aproximadamente una incidencia de 620,000 casos y 350,000 muertes. La incidencia en México ocupa el tercer lugar entre los cánceres ginecológicos, precediéndole el cáncer de mama en primer lugar y el cáncer cérvicouterino en segundo, el rango de edad en el que se presenta mayormente se encuentra entre 50 a 70 años (Gallardo-Rincón, et al. 2011, Globocan, 2018). Aunque más del 80% de las mujeres se benefician de la terapia de primera línea, la recidiva tumoral se produce en casi todos los pacientes (Liu & Matulonis 2010).

Se han estudiado diversas explicaciones para la recurrencia tumoral después de las terapias anticáncer, entre ellas la implicación de células troncales de cáncer (Ottevanger, 2017). Existe evidencia que indica que estas células troncales iniciadoras de tumores son el linaje responsable de la formación de tumores y que presentan características que soportan la letalidad del carcinoma ovárico. Es por ello, que conocer los mecanismos celulares que sustentan la fisiología de esta población resulta determinante no sólo para el entendimiento de la progresión de los tumores, también para el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos efectivos.

En las últimas décadas se han encontrado evidencias que sugieren que el sistema purinérgico participa en el desarrollo y la letalidad tumoral (DiVirgilio et al., 2018). Por ejemplo, el ATP puede promover la inmunosupresión indirectamente al causar la acumulación de adenosina en el MAT (Pellegrini et al., 2008); también ha demostrado que el incremento de ATP intracelular vía macropinocitosis aumenta la resistencia de las células cancerosas al tratamiento quimioterapéutico (Wang, et al., 2017) y se ha reportado que casi todas las líneas de células tumorales y biopsias de tumores sólidos expresan o sobreexpresan la mayoría receptores P2 (Burnstock & Di Virgilio, 2013), los cuales además se han relacionado con la EMT en el cáncer (Martínez-Ramírez et al., 2016).

A pesar de ello, no existen estudios que analicen el papel del sistema purinérgico en las células troncales iniciadoras de tumores de carcinoma ovárico, los cuales pueden representar nuevas dianas terapéuticas.

De esta manera, el desarrollo de este proyecto de investigación contribuirá en el estudio del sistema purinérgico, específicamente en la caracterización de los receptores de este sistema en CCGP, un tipo de células troncales iniciadoras de tumores, lo que nos permitiría avanzar en el conocimiento de los mecanismos celulares que envuelven el cáncer de ovario.

HIPÓTESIS

Las células poliploides gigantes seleccionadas de la línea celular SKOV-3, derivada de carcinoma ovárico, presentan respuestas diferenciales de liberación de $[Ca^{2+}]_i$ a agonistas purinérgicos, con respecto a la línea parental; lo que refleja adaptaciones que pueden incidir en su capacidad tumorigénica y en su resistencia a agentes terapéuticos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar las respuestas de movilización de $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por agonistas purinérgicos en células poliploides gigantes derivadas de la línea de carcinoma ovárico SKOV-3 y compararlas con las respuestas generadas en la línea celular no seleccionada.

Objetivos específicos

Estandarizar la selección de células poliploides gigantes a partir de la línea de carcinoma ovárico SKOV-3.

Evaluar marcadores de la EMT en células poliploides derivadas de las líneas celulares SKOV-3 por RT-PCR

Evaluar la funcionalidad de receptores purinérgicos expresados en células poliploides seleccionadas en contraste con la línea parental cultivada en monocapa por medio del registro de cambios en la $[Ca^{2+}]_i$, utilizando la farmacología disponible dirigida contra los receptores purinérgicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

En los experimentos se utilizó la línea celular humana de cáncer de ovario SKOV-3 (ATCC® HTB-77™) derivada de carcinoma ovárico y aislada de cuerpos ascíticos. Las células SKOV-3 se cultivaron en cajas para cultivo de tejidos (Nest) de 6 y 10 cm de diámetro, en un medio RPMI 1640 (Gibco), complementado con suero fetal bovino (SFB, Gibco) al 10% y antibiótico-antimicótico (Gibco).

Para mantener la línea celular, se realizaron pases cuando la confluencia celular se encontraba entre el 80 y el 90 %. Para todos los experimentos se utilizaron células a las cuales no se les hubiera realizado más de 18 pases.

Enriquecimiento de células gigantes poliploides a partir de cultivos de células SKOV-3.

Con el objetivo de estudiar células de carcinoma ovárico con características troncales, recurrimos al modelo experimental de hipoxia generada por tratamiento con CoCl_2 para la selección de células poliploides en el cultivo; se utilizaron cultivos celulares de la línea SKOV-3 (ATCC® HTB-77™) con una confluencia del 80%-90%, a los cuales se les trató durante 3, 4 o 5 días con RPMI sin suero y adicionado con CoCl_2 [300 μM]; el medio se cambió cada dos días (Zhang et al, 2014).

Marcaje del citoesqueleto con faloidina-rodamina y medición de núcleos.

Para este procedimiento, las células fueron cultivadas en cubreobjetos, los cultivos celulares con los diferentes tratamientos fueron lavados 2 veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS, en mM: NaCl 136, KCl 2.7, Na_2HPO_4 10 y KH_2PO_4 1.8, pH 7.4), fijados por 20 min en una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS, y permeabilizados en tritón-X100 al 0.1% durante 5 min e incubados por 10 min en una solución 1:1000 de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en PBS. Finalmente fueron montados en medio Vecta Shield conteniendo faloidina acoplada a rodamina (Vector Labs). Las imágenes fueron obtenidas en el microscopio de fluorescencia APOTOME (Karl Zeiss) y analizadas en el software Image J (NIH-EUA)

Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa

Con el fin de hacer evidentes los cambios en la expresión de genes marcadores de la transición epitelio-mesénquima, utilizamos transcripción reversa (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Así, aislamos el RNA total de células SKOV-3 intactas o cultivadas en presencia de 300 μM de CoCl_2 por 3, 4 ó 5 días. La purificación del RNA fue realizada utilizando el reactivo Trizol, de acuerdo con el protocolo del fabricante. La pureza y concentración del RNA obtenido fue evaluada por espectrofotometría, analizando la muestra a dos longitudes de onda (260 y 280 nm) en el espectrofotómetro Nanodrop.

Utilizando 3 μg de RNA realizamos una reacción de transcripción reversa para obtener el cDNA, el cual fue utilizado como templado para reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos específicos. El protocolo de amplificación consistió en: 3 min a 95°C, 33 ciclos de 30" a 95°C, 40" a la temperatura de alineamiento indicada en el cuadro de abajo y 40" a 72°C y finalmente 3" a 72°C. Las amplificaciones se analizaron por electroforesis en geles de agarosa.

Tabla 2. Número de acceso al NCBI, secuencia de los oligonucleótidos y longitud del amplicón, de los transcritos analizadas como marcadores de la EMT.

| Transcrito | Secuencia de los iniciadores | ID NCBI | T alineamiento | Longitud del amplicón |
|------------|--|-----------|----------------|-----------------------|
| VIM | F: CCCTTGACATTGAGATTGCC R: CGTGATGCTGAGAAGTTTCG | NM_003380 | 55°C | 213 pb |
| CDH1 | F: AGAGGACCAGGACTTTGAC R: CACGAGCAGAGAATCATAAGG | NM_004360 | 55°C | 211 pb |
| SNAI1 | F: CAATCGGAAGCCTAACTACAG R: ACAGAGTCCCAGATGAGC | NM_005985 | 55°C | 153 pb |
| GAPDH | F: CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG R: GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG | NM_002046 | 57°C | 497 pb |

Marcaje por inmunofluorescencia

La identificación de la glicoproteína CD133 se realizó de acuerdo con el protocolo descrito previamente (Vázquez-Cuevas et al., 2013). Brevemente: Las células fueron cultivadas en cubreobjetos, se lavaron con PBS 1X y se fijaron en PFA al 4% por 10 min, a continuación fueron permeabilizados en tritón X100 al 0.1% en PBS durante 30 segundos y bloqueados en

una solución de leche libre de grasas al 5% en PBS por 1h a temperatura ambiente. Posteriormente la preparación fue incubada por una noche con el anticuerpo primario y por 1h con el secundario. Finalmente se realizó el montaje de las muestras en VectaShield adicionado con DAPI (VectorLabs). El anticuerpo primario anti-CD133 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) se utilizó en dilución 1:100, y el anticuerpo secundario, anti-conejo IgG acoplado a Alexafluor488 (Life Technologies), fue diluido 1:1000. Las muestras se analizaron por microscopía confocal (LSM 510, Karl Zeiss).

Registro de $[Ca^{2+}]_i$ por microscopia funcional.

Se realizaron registros de los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ en células SKOV-3 control y en los modelos de células poliploides tratadas con $CoCl_2$.

Las células control y las células poliploides fueron cultivadas en cubreobjetos de 1 cm de diámetro, las primeras se dejaron cultivando durante 24 horas, mientras que las células poliploides se cultivaron en los portaobjetos desde 48 horas antes del inicio del tratamiento al que fueron sometidas. Posteriormente los cultivos se cargaron con fluo-4/AM ([1.8 μ M]) (Invitrogen) en solución Krebs (en mM: 150 NaCl, 1 KCl, 1 MgCl₂, 1,5 CaCl₂, 4 glucosa, 10 HEPES y 0.05% BSA, pH 7.4, en la incubadora a 37°C, durante 30 minutos.

El fluo-4/AM es un fluoróforo que tiene afinidad por el Ca^{2+} y está acoplado a un grupo acetoximetil éster (AM) que lo acarrea al interior de la célula, en el medio extracelular se mantiene inactivo, pero al encontrarse en el citoplasma las esterasas intracelulares hidrolizan el grupo AM, quedando el fluoróforo en su forma activa (Navarro-Tableros et al., 2007).

Las células se colocaron en una cámara de registro de flujo constante que permitió visualizarlas con un microscopio invertido de epifluorescencia (ECLIPSE Ti2 R, Nikon). Utilizamos dos agonistas, UTP y ATP (Sigma-Alrich), para observar la respuesta de los diferentes receptores purinérgicos, los fármacos fueron aplicados por medio del Krebs en las concentraciones indicadas en cada experimento con un sistema de perfusión por gravedad (2ml/min).

El fluo-4 se excitó a 488 nm con una lámpara LED de alta potencia (TI2-D-LHLED), provocando la emisión de señales luminosas de 510 nm, las cuales fueron registradas por una cámara 01-Electro-M-14. Las imágenes de fluorescencia se adquirieron con el software Ocular a una

exposición de 300 ms y a intervalos de 500 ms, durante 120 s a temperatura ambiente. Las secuencias de imágenes se analizaron con el software ImageJ versión 1.52p en formato multi-tiff.

Fluo-4 es un fluorocromo de longitud de onda única y su fluorescencia es una función de la concentración de colorante, la vía de iluminación y $[Ca^{2+}]_i$ (Navarro-Tableros et al., 2007), a partir de ello, en los experimentos que realizamos se buscó registrar los cambios de fluorescencia asociados a las fluctuaciones de la $[Ca^{2+}]_i$.

A continuación, se calculó la $[Ca^{2+}]_i$ relativa, para lo que se dibujó el contorno delimitando así el área analizada de las células (ROI) que mostraron ΔF inducida por la aplicación del fármaco. Las variaciones en los índices del ΔF fueron obtenidas a partir de los valores en una escala de grises de 16 bits, los cuales fueron calculados por el algoritmo del software ImageJ, que asigna un valor numérico promedio para cada ROI. Los valores obtenidos en este análisis fueron normalizados.

Procesamiento de señales de Ca^{2+}

Los registros de Ca^{2+} fueron tratados para la corrección del fotoblanqueo, para lo cual primero se determinó el inicio de la respuesta de fluorescencia (punto mínimo de la curva); a continuación, se consideró como estado basal la respuesta registrada hasta antes del punto mínimo de la curva. Al estado basal se ajustó una curva exponencial, la cual se extendió al resto del registro posterior al punto mínimo. Finalmente, dicha curva exponencial fue restada a la respuesta de fluorescencia.

Para el cambio de fluorescencia se calculó como $\Delta F / F = (f - f \text{ línea base}) / f \text{ línea base}$ (Guo et al.). El preprocesamiento (incluida la corrección de la línea base, la detección de eventos basada en el umbral) y la búsqueda de amplitud máxima fueron realizados por un programa personalizado en Python.

Análisis estadístico

Todos los datos se probaron con la prueba de Kolmogorov Smirnov para determinar la normalidad y se confirmó que tenían una distribución normal, excepto lo indicado.

Se obtuvieron la amplitud y el área bajo la curva de la respuesta al estímulo de cada célula.

Se realizó una curva concentración-respuesta (DR); se calculó la concentración efectiva media máxima (CE_{50}) para cada agonista y tratamiento a partir de los datos normalizados obtenidos de los registros de $[Ca^{2+}]_i$, se determinó la amplitud de las curvas obtenidas del ΔF de cada célula, estos valores se utilizaron para aplicar el método de regresión no lineal para una curva de ajuste concentración-respuesta.

Se utilizó ANOVA de una vía y la prueba de Dunnett para el análisis de longitud de núcleos y ANOVA de dos vías y la prueba de Tukey para la comparación de medias del área bajo la curva de las diferentes condiciones en las que se midió el cambio de la $[Ca^{2+}]_i$. Todos los valores se expresan como media \pm DE (desviación estándar). Se utilizó el software GraphPad-Prism 7.0 (San Diego California USA, 2017).

RESULTADOS

Células Cancerígenas Gigantes Poliploides

Para el estudio de la actividad de los receptores purinérgicos en CIT, utilizamos el modelo CoCl_2 en células SKOV-3 de carcinoma ovárico. Dicho modelo permite la selección de CCGP, las cuales se han identificado como células precursoras de las CIT (Zhang et al, 2014). La selección de las CCGP se lleva a cabo al someter a condiciones de estrés a los cultivos de células SKOV-3 por medio de la inducción de hipoxia. El CoCl_2 a [300 μM] se aplicó al cultivo celular en tres condiciones de tiempo diferentes, durante 3,4 y 5 días; con el fin de determinar qué condiciones favorecen la selección de las CCGP.

Como se puede observar en la figura 5, posterior al tratamiento con CoCl_2 ocurre un aumento en el tamaño de los núcleos de células tratadas, los cuales fueron marcados con DAPI y se observan en azul. El marcaje de los filamentos de actina marcados con faloidina-rodamina, que se muestran en color rojo, reveló que en las células con núcleos grandes se observa una disminución de las denominadas “fibras de estrés” desde el día 3 con el tratamiento de CoCl_2 , sin embargo, en 5 días de tratamiento se observan alteraciones en el citoesqueleto que sugieren desorganización.

Una de las características principales del enriquecimiento de los cultivos con CCGP es el incremento en el tamaño del núcleo, las primeras observaciones sugirieron que este fenómeno estaba presente en nuestros cultivos tratados con CoCl_2 . Para confirmar nuestras observaciones se analizó la longitud del eje mayor de los núcleos (medidos en μm) en los cuatro grupos (control, 3,4 y 5 días de tratamiento). Los datos fueron analizados por un análisis de varianza (figura 6), en el cual se obtuvo diferencias significativas para los tres grupos experimentales en comparación con el grupo control ($p < 0.0001$ para las condiciones 3 y 5 días de tratamiento; $p < 0.001$ para la condición de 4 días de tratamiento; ANOVA y Dunnett test).

La media de la longitud de los núcleos del grupo control fue de 17.78 μm , siendo el grupo que se trató durante 3 días con CoCl_2 el que reportó mayor aumento en la longitud de los núcleos en comparación con el grupo control (± 0.52 μm , $p < 0.0001$), ya que su media fue de 21.16 μm . Mientras que el grupo tratado durante 4 días fue el que mostró el menor

incremento en la longitud de los núcleos con una media de 19.68 μm . Para este análisis se utilizó una muestra de 150 células para cada grupo.

Es de resaltar que en la gráfica de la figura 6 se pueden observar núcleos con una longitud hasta 3 veces mayor a la media del grupo control tras 3,4 y 5 días de tratamiento.

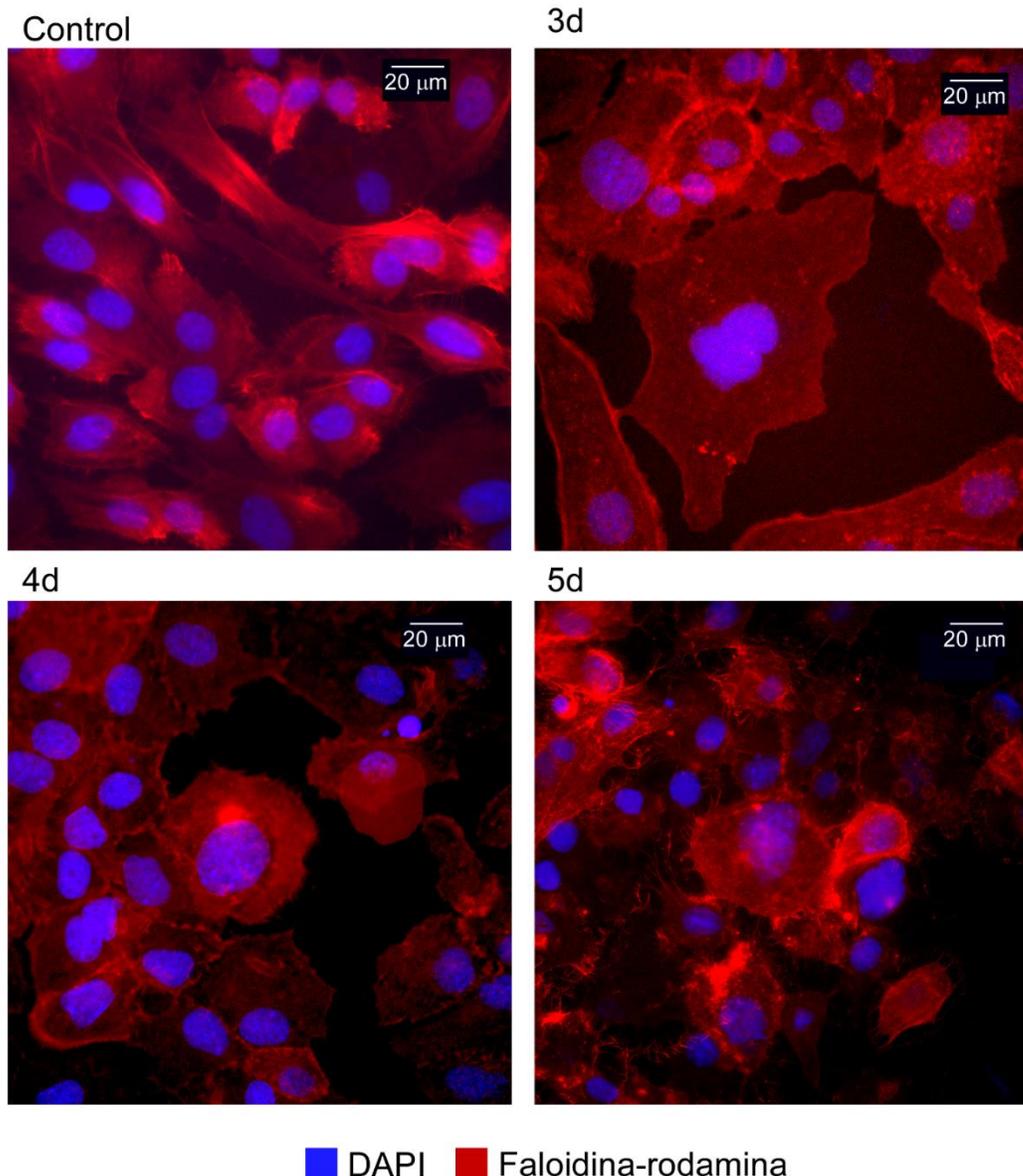


Figura 5. CCGP seleccionadas con CoCl_2 .

Las imágenes nos muestran células SKOV-3 cultivadas en monocapa (control) y CCGP seleccionadas con CoCl_2 durante 3, 4 y 5 días; en rojo se muestra el citoesqueleto de actina marcado con faloidina-rodamina, y en azul los núcleos marcados con DAPI los cuales aumentan su tamaño en las CCGP.

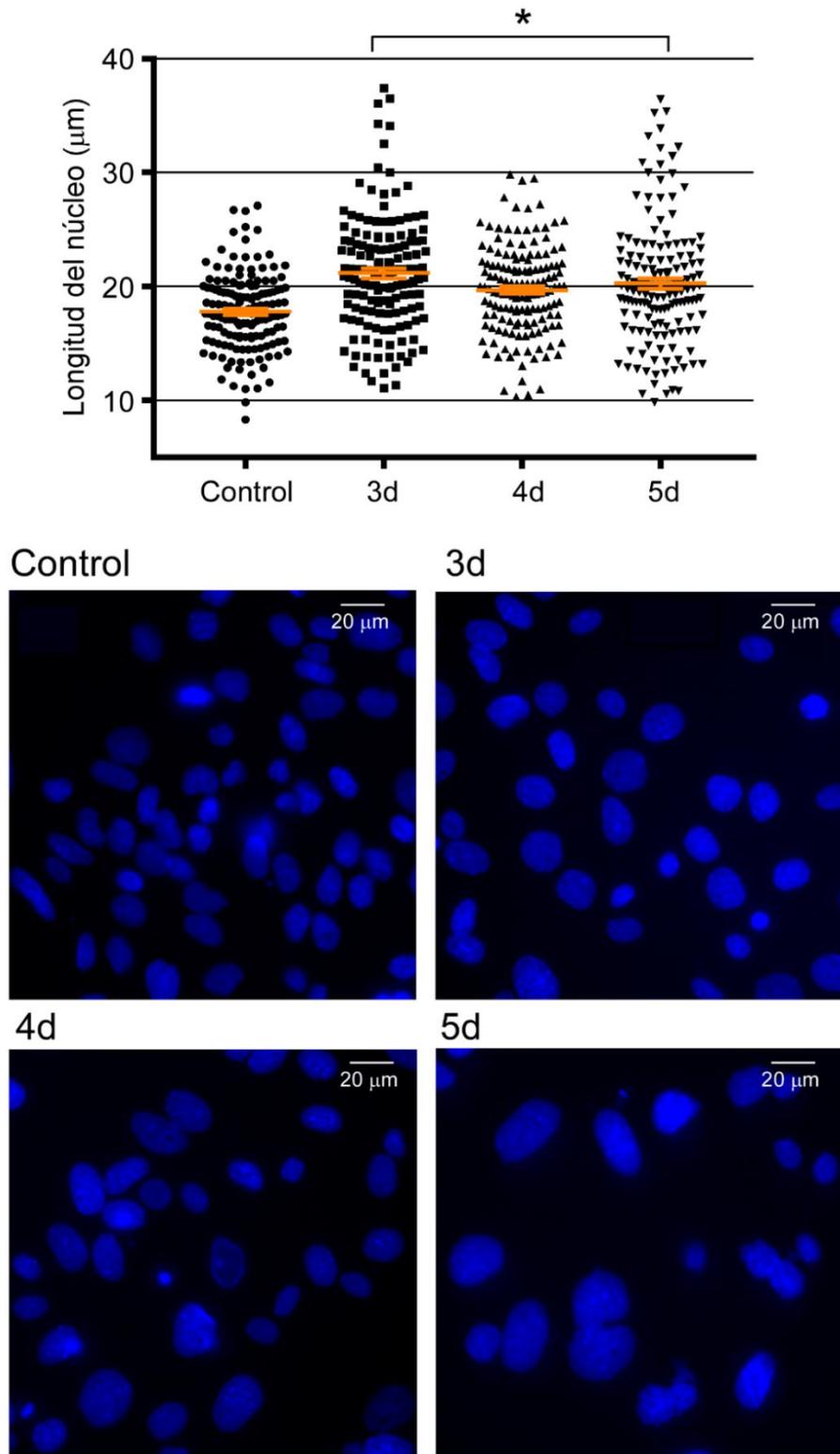


Figura 6. Análisis de la longitud de los núcleos en CCGP.

La gráfica muestra la longitud de los núcleos medida en μm y la comparación de las medias entre los grupos. Los datos indicaron un aumento significativo en la longitud de los núcleos de las CCGP en las tres condiciones del tratamiento ($p < 0.0001$ para 3 y 5 días; $p < 0.001$ para 4 días de tratamiento; ANOVA y test de Dunnett). La imagen muestra los núcleos en azul (marcados con DAPI) en condición control y tratadas durante 3, 4 y 5 con CoCl_2 .

Marcadores de EMT y troncalidad

Partiendo de investigaciones previas, en las que se asocia a la actividad de HIF-1 α con la selección y mantenimiento de células troncales cancerosas (Zhang et al, 2014), y el planteamiento de una relación directa entre la selección de células con características troncales y la inducción de la EMT (Chen et al., 2013), se continuó con la caracterización de las CIT derivadas de CCGP con experimentos que permitieron identificar la presencia de marcadores de EMT y troncalidad en las células seleccionadas con CoCl₂.

En primera instancia, se utilizaron las técnicas de RT y PCR con la finalidad de identificar la expresión de genes marcadores de la EMT en las células SKOV-3 tratadas con CoCl₂ durante 3, 4 y 5 días.

Para ello se analizó la expresión de los transcritos que codifican para las proteínas *Vimentina* y *SNAIL*, ya que *Vimentina* se encuentra en el citoesqueleto de células que han adquirido un fenotipo mesenquimal tras la EMT. Mientras que *SNAIL* regula la inducción de la EMT de manera directa mediante la unión al promotor de E-caderina, reprimiendo la expresión de esta misma (Lamouille et al., 2014).

Por último, se analizó la expresión de *CDH1* (Caderina-1) o también conocido como *E-caderina*, una molécula de adhesión que permite el contacto entre las células del epitelio y al ser suprimida su expresión por factores de transcripción inductores de la EMT como *SNAIL*, se genera una disrupción de las uniones entre las células y una pérdida del contacto entre las células y la lámina basal (Lamouille et al., 2014).

Los resultados que podemos observar en la figura 7, mostraron que *Vimentina* se expresó en las células SKOV-3 control y en las células tratadas con CoCl₂ durante 3, 4 y 5 días por igual. *CDH-1* se expresó principalmente en las células SKOV-3 control, mientras que *SNAIL* si se expresó en las células tratadas con CoCl₂ durante 3, 4 y 5 días y no en las SKOV-3 control. Se utilizó *GAPDH* (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) como transcrito control en todas las condiciones.

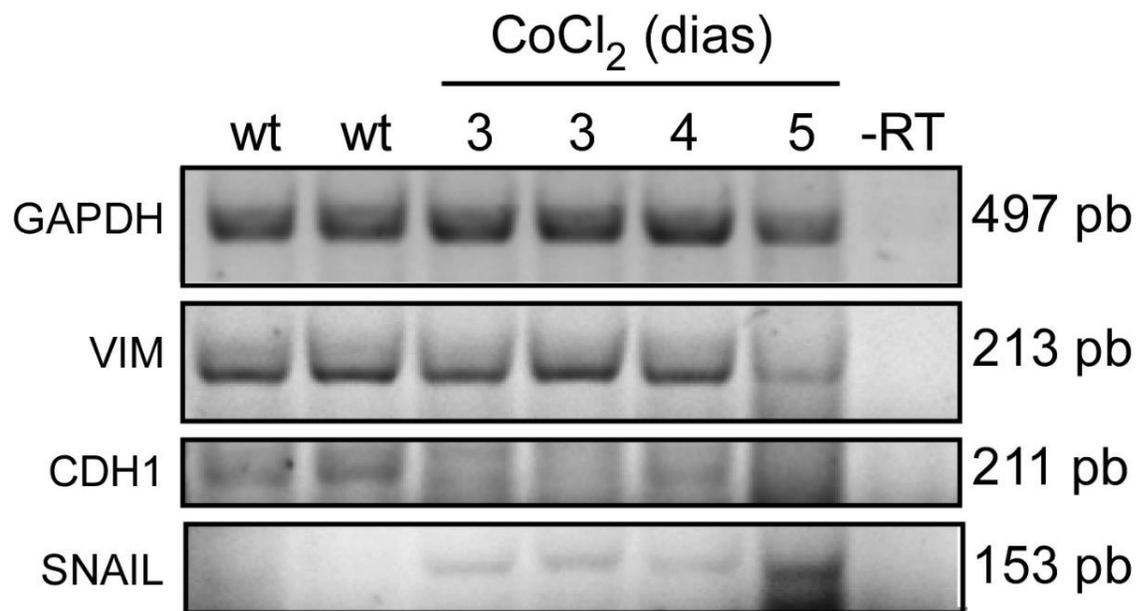


Figura 7. Expresión de marcadores de EMT en células tratadas con CoCl₂.

Se realizó RT y PCR en células control y tratadas con CoCl₂ para identificar la expresión de *GAPDH* (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) el cual funge como un transcrito control; *VIM* (vimentina), marcador de células mesenquimales, el cual se expresó en las cuatro condiciones; *CDH1*, marcador de células epiteliales, se observa su expresión en la condición control, pero no en las células tratadas con CoCl₂ bajo ninguna condición del tratamiento; por último, *SNAIL* marcador de la EMT, se observó expresado solamente en las células tratadas durante 3, 4 y 5 días con CoCl₂ y no en las células control.

Para determinar si las células tratadas con CoCl₂ expresaban marcadores de troncalidad, se utilizó la técnica de inmunofluorescencia, con la cual se identificó la expresión de CD133 una glicoproteína transmembranal la cual se ha reportado frecuentemente en células cancerígenas con características troncales (Ferrandina et al, 2008), utilizando un anticuerpo primario específico contra la proteína y un anticuerpo secundario acoplado a Alexafluor488.

En la figura 8 se puede apreciar una imagen obtenida por microscopía confocal, en la que se observa la expresión de CD133 en color verde, alrededor de núcleos teñidos con yoduro de propidio en color rojo de células SKOV-3 tratadas durante 3 días con CoCl₂.

Lo que confirma que células cancerígenas seleccionadas con este tratamiento químico, muestran marcadores de troncalidad, una característica más de las CCGP.

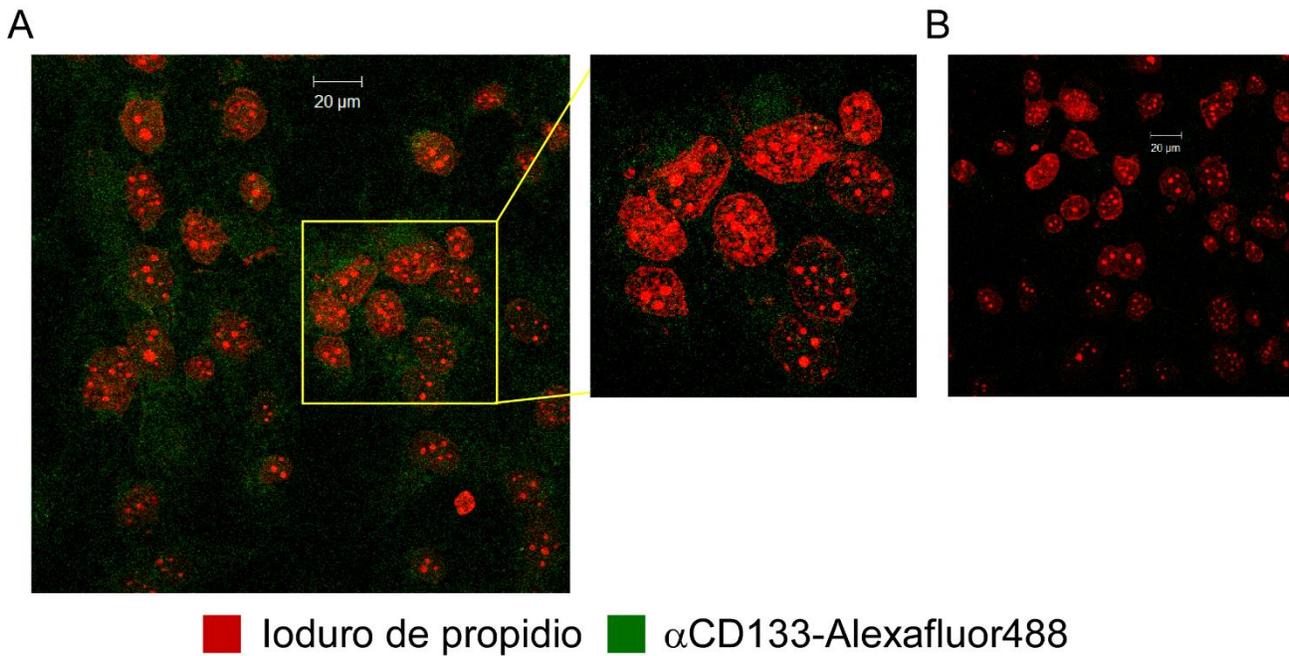


Figura 8. Expresión de CD133 en células tratadas con CoCl₂.

A) Se utilizó Ioduro de propidio para el marcaje en color rojo de núcleos de células tratadas durante 3 días con CoCl₂, mientras que en verde se observa la expresión de CD133 marcado con Alexafluor488. B) En la imagen del lado izquierdo se muestra un acercamiento de la imagen A, en donde se aprecia la expresión de CD133. En la imagen del lado derecho se muestra un negativo de Alexafluor488, en donde efectivamente no se registra expresión de CD133.

A partir de estos resultados proponemos que las células SKOV-3 sometidas a estrés mediante hipoxia inducida por el tratamiento de CoCl₂ se seleccionan de manera exitosa, y lo demostramos tras la identificación de características de CIT, como la expresión de *Vimentina* y *SNAIL* indicadores de la inducción a EMT, la ausencia de la expresión de *CDH1* y la expresión de CD133.

De manera específica, los resultados sugieren que las células seleccionadas con este tratamiento de hipoxia son las CCGP, ya que estas células se caracterizan por su núcleo gigante, entre 3 y 10 veces más grande que el núcleo de células no patológicas (Malpica, et al. 2004; Zhang et al, 2014), lo que concuerda con los resultados reportados tras el análisis de longitud de núcleos, el cual indicó un incremento significativo especialmente tras 3 días de tratamiento con CoCl₂.

Respuesta de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por ATP y UTP

Una vez caracterizado el modelo de las CIT, se continuó con el análisis de las respuestas inducidas por ligandos purinérgicos en las células SKOV-3 tratadas con $CoCl_2$ durante 3 y 4 días. Para ello se utilizó la $[Ca^{2+}]_i$ como parámetro para estudiar las respuestas funcionales de los receptores purinérgicos con la aplicación de los agonistas ATP y UTP.

El ATP es el agonista natural de los receptores P2, por lo que activa a todos los receptores (P2X y P2Y) con una potencia diferencial (Ralevick y Burnstock 1998; Coddou et al., 2011); la estimulación con ATP es un indicativo de receptores purinérgicos funcionales pero no nos permite deducir su identidad. Por otra parte, el UTP activa selectivamente a los receptores P2Y₂ y P2Y₄ (Von Kugelgen), particularmente el receptor P2Y₂ ya ha sido descrito en la línea SKOV-3 y hemos caracterizado algunas de sus implicaciones funcionales (Martínez-Ramírez et al., 2016) por lo que estamos interesados en su caracterización en las CCGP.

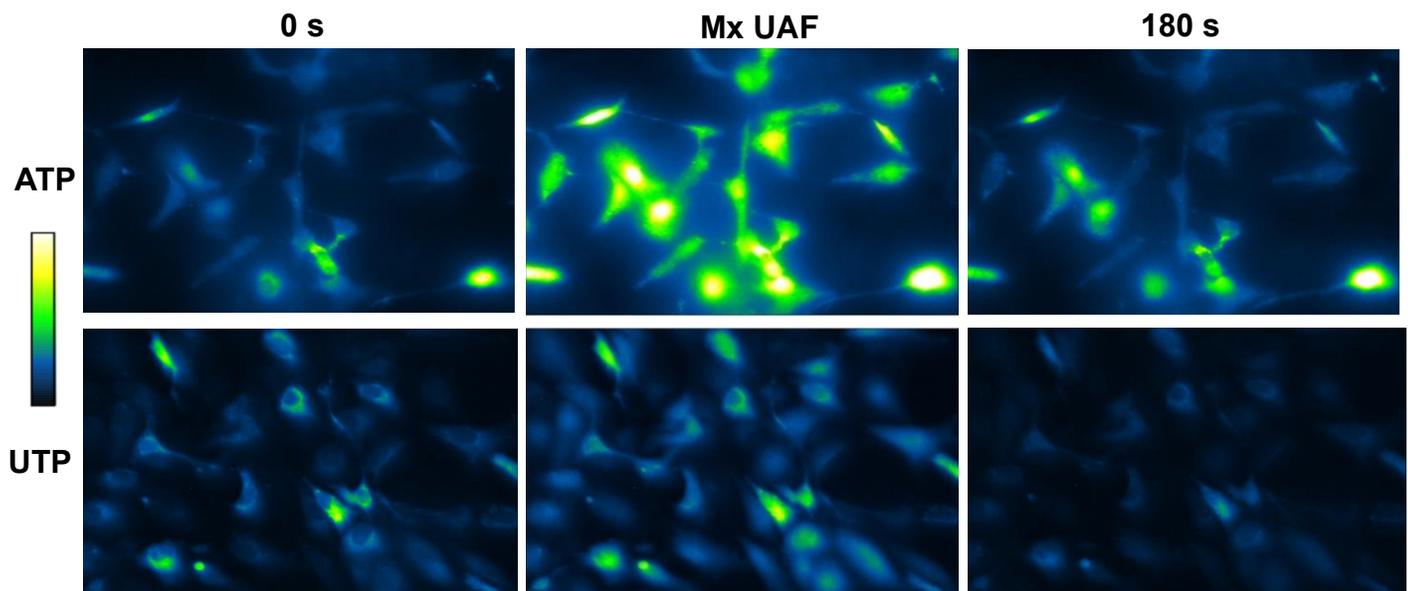


Figura 9. Imágenes representativas de registros de $[Ca^{2+}]_i$.

Se muestra la fluorescencia de las células SKOV-3 control al inicio (0 s) del registro, en el momento del máximo UAF (Mx UAF) y al final (180 s) del registro, tras la estimulación de ATP y UTP a una concentración de 100 μM , posterior a la incubación durante 30 minutos con Fluo-4/AM.

La $[Ca^{2+}]_i$ se midió mediante los ΔF en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) con ayuda del fluoróforo Fluo4-AM como se detalla en el método. En la figura 9 se muestran imágenes de momentos representativos de registros de células control estimuladas a 100 μM de ATP y UTP. Los registros de la $[Ca^{2+}]_i$ se realizaron utilizando diferentes concentraciones de los agonistas ATP y UTP (100 μM , 10 μM , 1 μM , 100 nM, 10 nM y 1 nM) en cultivos celulares en las tres condiciones experimentales (control, 3 y 4 días con tratamiento de $CoCl_2$). Los valores para determinar el ΔF de la respuesta de cada célula ante los estímulos farmacológicos se obtuvieron a partir de la amplitud máxima de las curvas generadas ante el cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ de cada célula registrada.

A partir de los datos obtenidos, se construyeron curvas concentración-respuesta (CR) de cada uno de los grupos, lo que permitió determinar la concentración media máxima eficaz (EC_{50}), valor que se utiliza en farmacología para indicar la concentración necesaria de un agonista para obtener un efecto del 50% (tabla 3). Para las células estimuladas con ATP, se aplicó una regresión logarítmica no lineal ajustada a una curva bifásica, de la cual se obtuvieron dos EC_{50} , lo que podría estar indicando la expresión de dos o más poblaciones de receptores que responden a este agonista en concentraciones de diferentes órdenes de magnitud. En el grupo control la respuesta máxima fue de 1.537 UAF normalizadas, y los valores de la $EC_{501} = 53.7$ nM y la $EC_{502} = 10.5$ μM .

La respuesta de las dos poblaciones de receptores ante ATP se mantuvo posterior al tratamiento con $CoCl_2$, sin embargo, se observaron diferencias en la $[Ca^{2+}]_i$ en comparación con el grupo control, ya que, a los 3 días de tratamiento, la respuesta máxima fue de 0.3 UAF normalizadas, mientras que la $EC_{501} = 208$ nM y la $EC_{502} = 37.2$ μM . A los 4 días de tratamiento, la respuesta máxima fue de 0.4 UAF normalizadas, mientras que la $EC_{501} = 116.6$ nM y la $EC_{502} = 93.7$ μM , (tabla 3). Como mencionamos anteriormente, el ATP activa a receptores P2X y P2Y, lo que podría estar reflejando en las curvas CR bifásicas en las que se observan más de una población de receptores respondiendo a este agonista.

Tabla 3. Valores obtenidos en las curvas CR de los diferentes tratamientos.

| Tratamiento | EC₅₀ | Valor Máximo |
|--------------------------|---|---------------------|
| ATP control | EC ₅₀ 1 = 53.7 nM EC ₅₀ 2 = 10.5 μM | 1.537 UAF |
| ATP 3d CoCl ₂ | EC ₅₀ 1 = 208 nM EC ₅₀ 2 = 37.2 μM | 0.3 UAF |
| ATP 4d CoCl ₂ | EC ₅₀ 1 = 116.6 nM EC ₅₀ 2 = 93.7 μM | 0.4 UAF |
| UTP control | 997 nM | 0.72 UAF |
| UTP 3d CoCl ₂ | 13.7 μM | 0.68 UAF |
| UTP 4d CoCl ₂ | 13 μM | 0.57 UAF |

En el caso de los datos obtenidos con las células estimuladas con UTP, se les aplicó la regresión logarítmica no lineal y se obtuvieron curvas monofásicas de CR. Para el grupo control la respuesta máxima fue de 0.72 UAF normalizadas y la EC₅₀ fue de 997 nM. A diferencia de los grupos tratados con CoCl₂ durante 3 y 4 días, en los cuales su respuesta máxima disminuyó a 0.68 y 0.57 UAF normalizadas, y las EC₅₀ 13.7 μM y 13 μM respectivamente. Siendo los grupos con tratamiento los que requieren mayor concentración de UTP para obtener el 50% del efecto del fármaco (figura 10).

También, a partir de los registros de la [Ca²⁺]_i, se calculó el área bajo la curva (abc) de cada respuesta celular tras la estimulación con los agonistas purinérgicos en la concentración de 100 μM (log -4). Este análisis mostró que en el grupo control la estimulación con ATP generó un ΔF

significativamente mayor ($p < 0.0001$) que el que generó la estimulación con UTP; mientras que en el grupo con 3 días de tratamiento de CoCl_2 fue la estimulación con UTP la que generó un cambio significativamente mayor ($p < 0.0001$) en comparación con la que se generó con ATP (figura 11). En el caso del grupo con 4 días de tratamiento no se observaron diferencias significativas entre los ΔF generados con los dos agonistas.

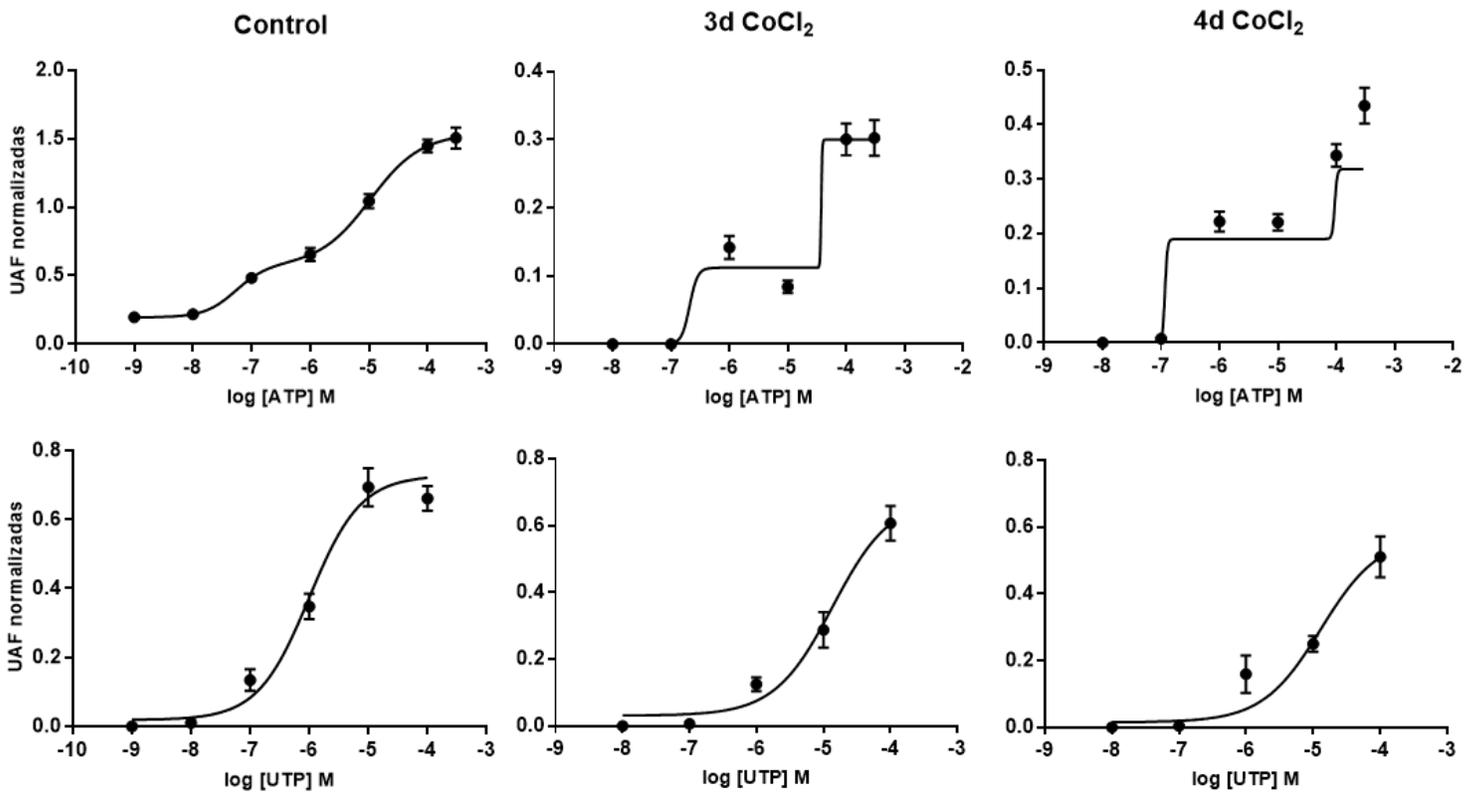


Figura 10. Relación CR de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ generada por ATP y UTP.

Curvas CR de las respuestas inducidas por ATP o UTP en concentraciones que van desde $100 \mu\text{M}$ hasta 1 nM para las condiciones control y de $100 \mu\text{M}$ hasta 10 nM para los grupos tratados con CoCl_2 . La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se expresó en UAF normalizadas. Para las curvas de ATP, se registraron $\text{EC}_{501} = 53.7 \text{ nM}$ y $\text{EC}_{502} = 10.5 \mu\text{M}$ (control), $\text{EC}_{501} = 208 \text{ nM}$ y $\text{EC}_{502} = 37.2 \mu\text{M}$ (3 días con CoCl_2) y $\text{EC}_{501} = 116.6 \text{ nM}$ y $\text{EC}_{502} = 93.7 \mu\text{M}$ (4 días con CoCl_2). En las curvas de UTP las EC_{50} fueron de 997 nM (control), $13.7 \mu\text{M}$ (3 días con CoCl_2) y $13 \mu\text{M}$ (4 días con CoCl_2).

En cuanto a la comparación del abc generado por ATP entre los tres grupos experimentales, se observó que el incremento de fluorescencia fue significativamente mayor (ANOVA y test de Bonferroni, $p < 0.0001$) en el grupo control en comparación con los dos grupos tratados con CoCl_2 (3 y 4 días), mientras que no se obtuvieron diferencias significativas entre estos dos últimos grupos. En el caso de la estimulación con UTP no se obtuvieron diferencias significativas en el ΔF entre los tres grupos experimentales.

Lo que sugiere que los receptores de UTP mantienen su respuesta constante, independiente a la inducción de hipoxia con el tratamiento de CoCl_2 , a diferencia de los receptores de ATP, los cuales en condiciones control tienen una mayor respuesta que los receptores de UTP, pero esta se ve disminuida de manera considerable tras la inducción de hipoxia con el CoCl_2 desde los 3 días con tratamiento.

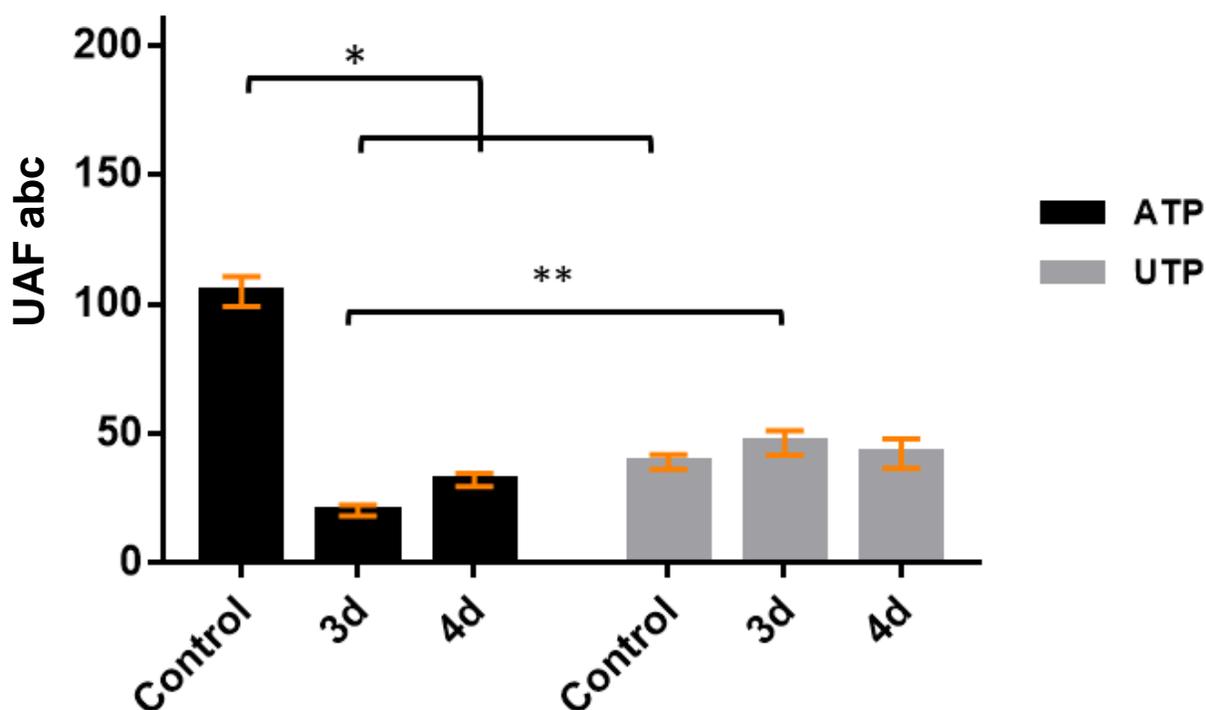


Figura 11. Área bajo la curva (abc) tras la estimulación de ATP y UTP.

Se determinó el ΔF a partir del área bajo la curva de cada respuesta celular ante la estimulación de los agonistas purinérgicos a $[100] \mu\text{M}$. El ΔF generado por ATP fue significativamente mayor que el generado por UTP en la condición control ($p < 0.0001$), mientras que tras 3 días con tratamiento de CoCl_2 la respuesta fue significativamente mayor al estimular con UTP ($*p < 0.0001$; ANOVA y test de Tukey). La respuesta generada con ATP en los grupos con tratamiento con CoCl_2 disminuyó significativamente en comparación con el grupo control ($**p < 0.0001$), pero no entre ellos. Mientras que el tratamiento con CoCl_2 no generó cambios en la respuesta generada con UTP.

Patrón temporal de la movilización de Ca^{2+} en CCGP inducido por ATP o UTP.

Posteriormente se graficó el ΔF a lo largo del tiempo generado por la estimulación con ATP o UTP. Para ello se determinó el punto de inicio (valor mínimo) de la respuesta a partir del estímulo con el agonista y se analizaron los siguientes 115 segundos del registro.

En la figura 12 se muestran las gráficas de los tres grupos estimulados con ATP a concentraciones de 100, 10 y 1 μM . En las cuales se puede apreciar que en la condición control, la fluorescencia regresa a su estado basal cuando las células son estimuladas con [1] μM , mientras que en las otras dos concentraciones (100 y 10 μM) la respuesta decae, pero no regresa al estado basal durante el tiempo de registro.

En el caso de las células tratadas 3 días con CoCl_2 y estimuladas con las tres concentraciones 100, 10 y 1 μM la fluorescencia decae progresivamente una vez que ha alcanzado su punto máximo y regresa a valores muy cercanos al estado basal. Patrón que se repite en las células tratadas durante 4 días con CoCl_2 y estimuladas a concentraciones de 10 y 1 μM . Para las células estimuladas a [100] μM la fluorescencia no regresó por completo a su estado basal, sin embargo, finalizó con valores más cercanos a este en comparación con el grupo control en las concentraciones 100 y 10 μM .

En la figura 13 podemos observar las gráficas de los tres grupos estimulados con UTP a concentraciones de 100, 10 y 1 μM , las cuales nos permiten observar que en la condición control la respuesta decae más rápido en comparación con los grupos en el que las células fueron tratadas con CoCl_2 , independientemente de la concentración con la que se estimuló. A pesar de ello, los valores que se registran al final de las respuestas de los grupos que fueron con CoCl_2 son cercanos a su estado basal. Siendo el grupo tratado durante 4 días con CoCl_2 y estimulado a [100] μM el que muestra los valores finales más alejados al estado basal entre todos los grupos estimulados con UTP.

Es importante remarcar que la estimulación tuvo una duración de 30 s, por lo que la respuesta tuvo una duración mayor al tiempo de estimulación.

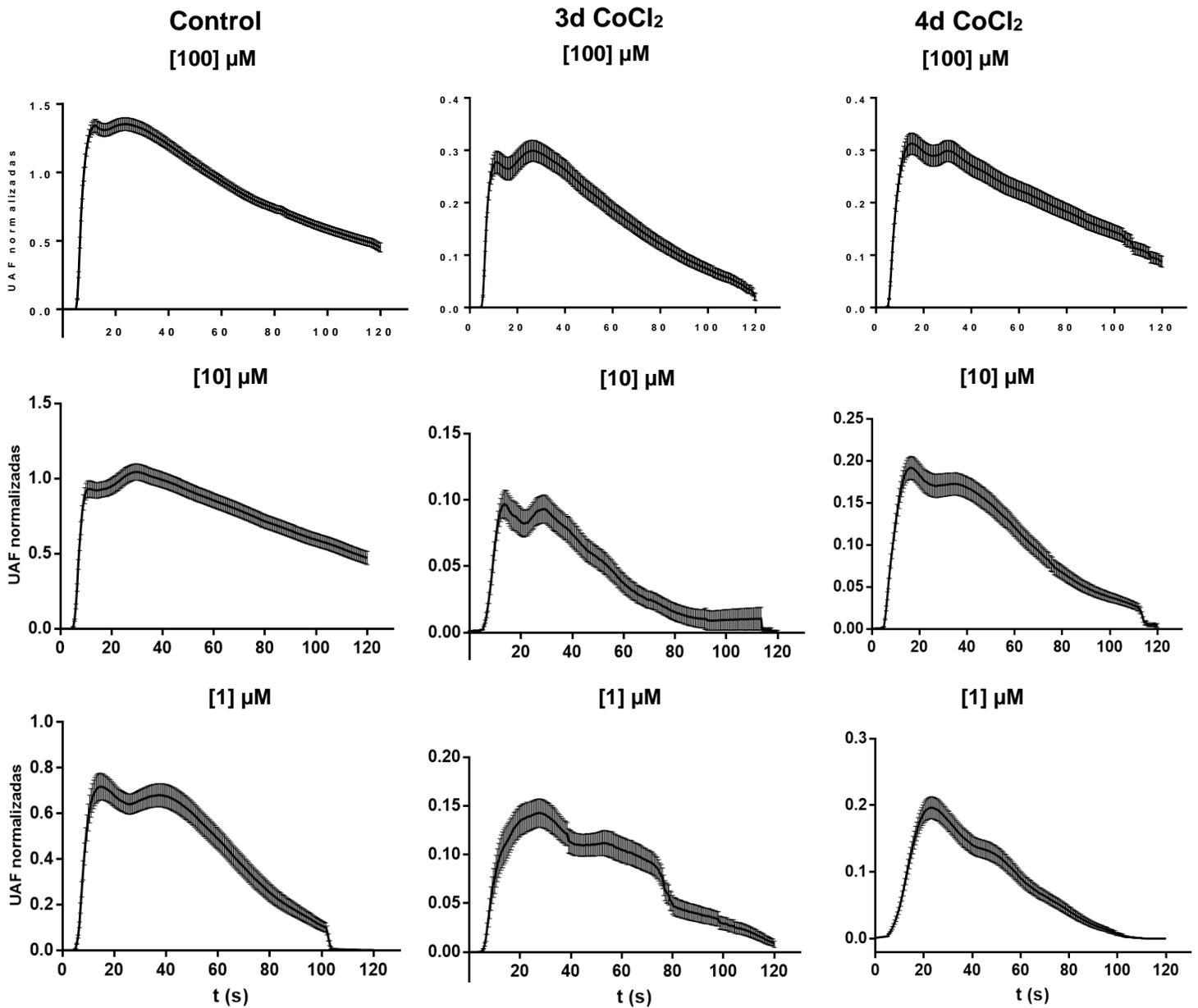


Figura 12. Curso temporal de las respuestas generada por ATP.

La línea negra continua representa la media (\pm DE) de las respuestas de las células a través del tiempo tras la estimulación con ATP en las concentraciones de 100, 10 y 1 μ M bajo las tres condiciones experimentales (control, 3 y 4 días con tratamiento de CoCl₂).

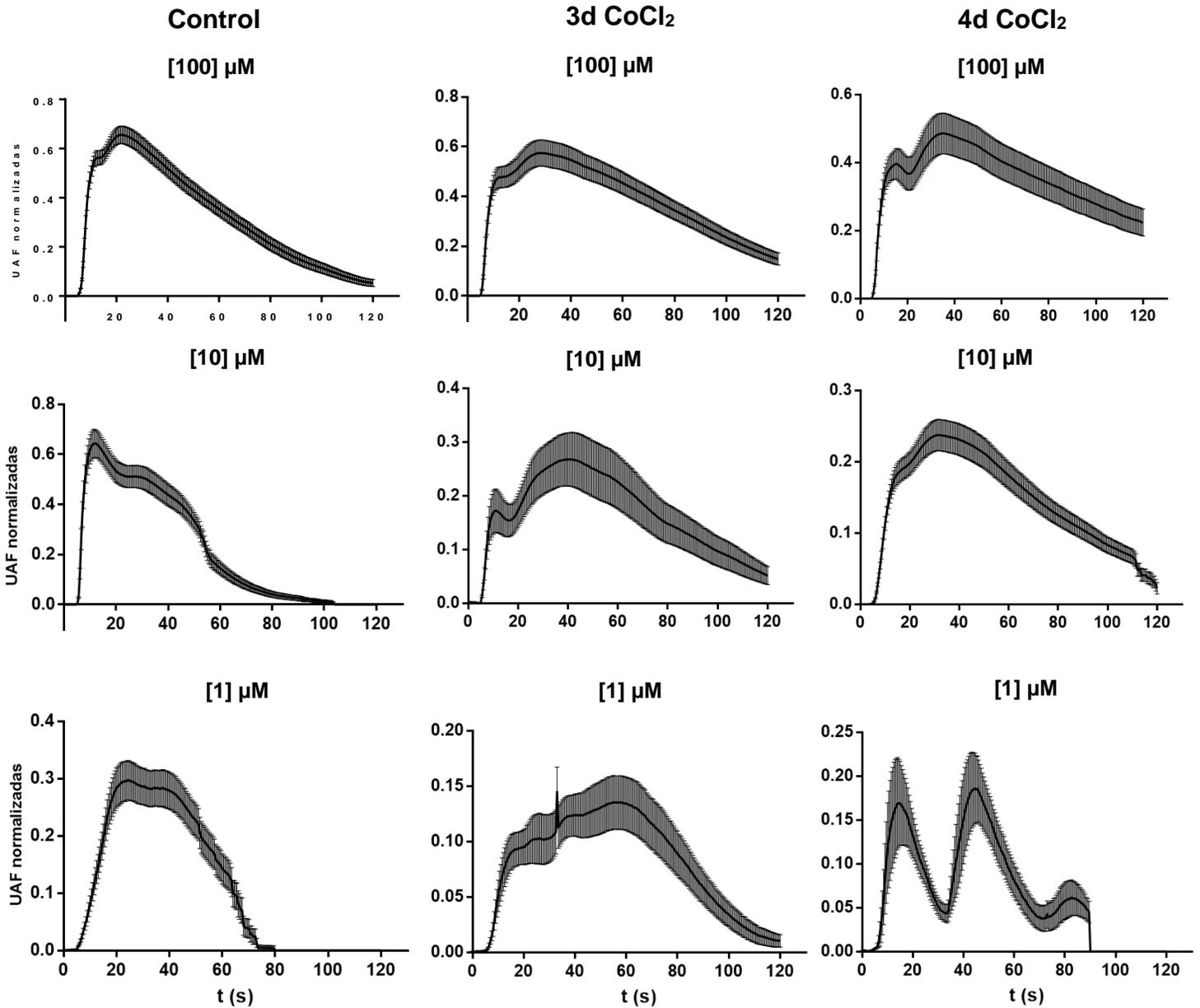


Figura 13. Curso temporal de las respuestas generada por UTP.

Se aprecia la media (\pm DE) de las respuestas de las células a través del tiempo tras la estimulación con UTP en las concentraciones de 100, 10 y 1 μ M bajo las tres condiciones experimentales (control, 3 y 4 días con tratamiento de CoCl₂).

Patrón intracelular de la movilización de Ca^{2+} inducido por ATP o UTP en CCGP

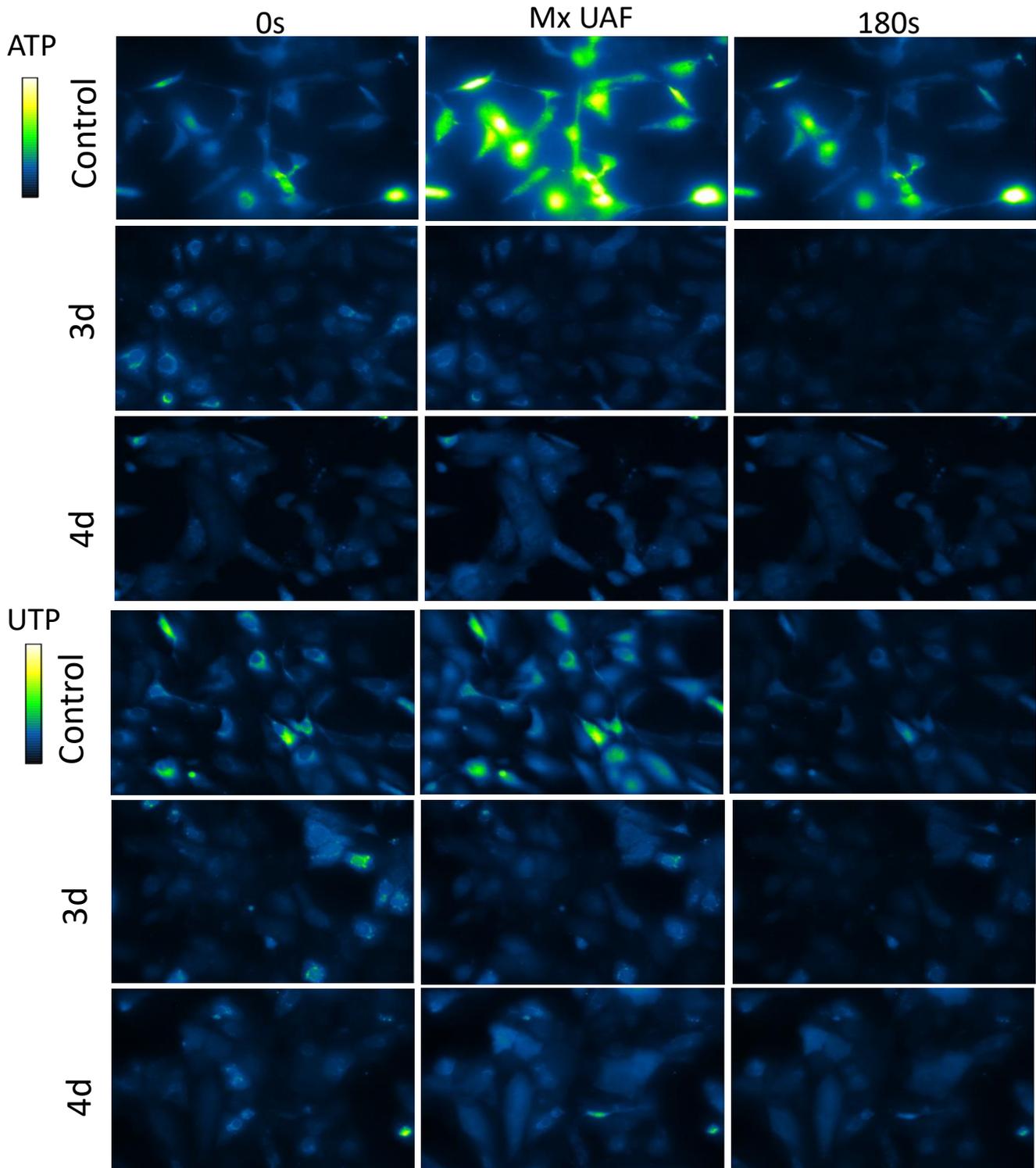


Figura 14. Imágenes de registros de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células SKOV-3 y con tratamiento de CoCl_2 .

Se muestra el ΔF al inicio del registro (0s), durante la Mx UAF y al final del registro (180s). Lo que permite apreciar la distribución espacio-temporal de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las diferentes condiciones experimentales.

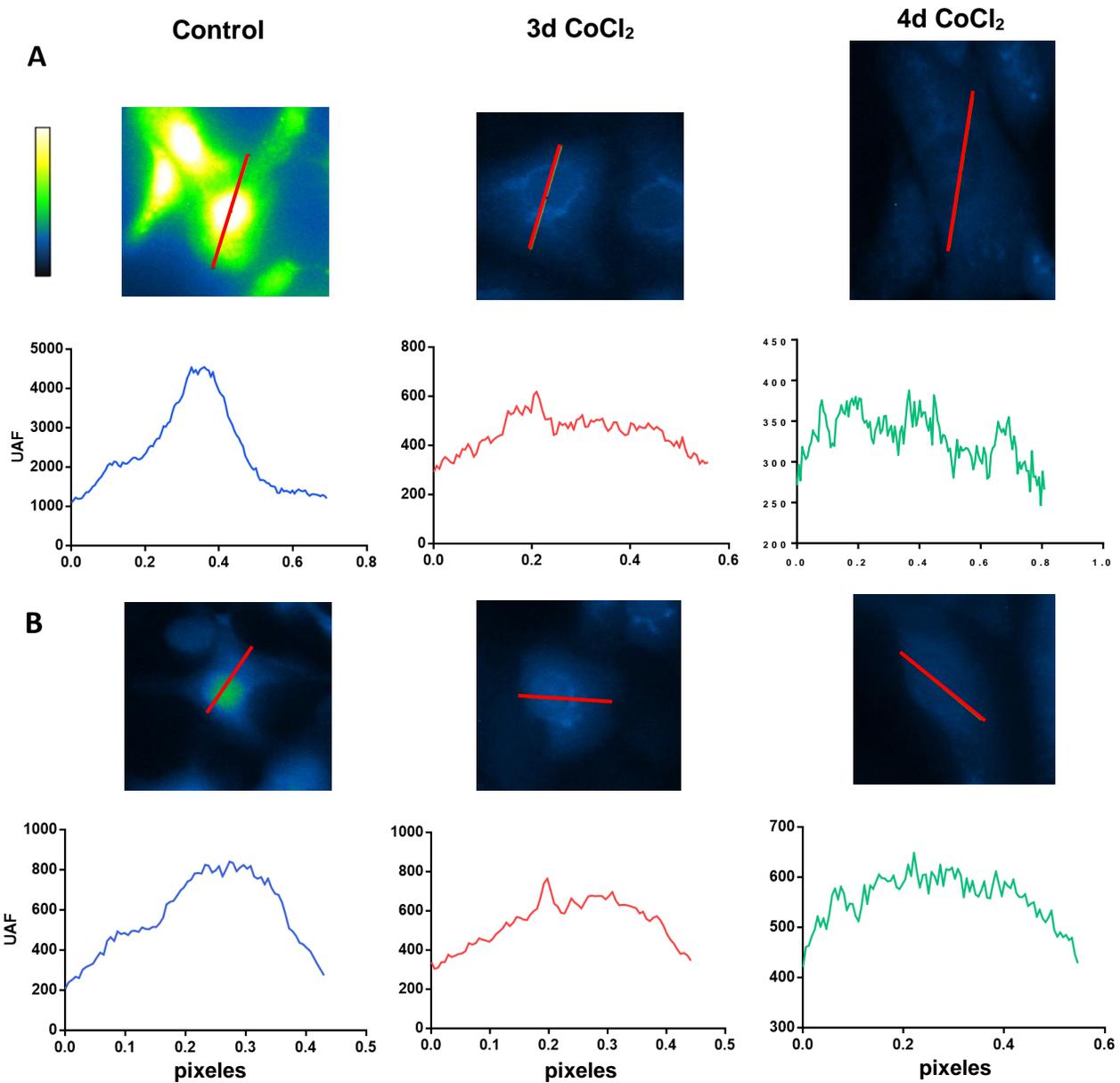


Figura 15. UAF al interior de la célula.

Imágenes representativas en el punto MxUAF al interior de la célula en el grupo control (azul) y los grupos con tratamiento de CoCl₂ durante 3 (rojo) y 4 (verde) días. Las gráficas muestran las UAF que se obtuvieron a partir del trazo marcado (línea roja) que va de un extremo a otro de la célula, pasando por el núcleo. A) Células estimuladas con ATP. B) Células estimuladas con UTP.

Es ampliamente reconocido que el Ca²⁺ está involucrado en la transducción de señales y juega un papel crucial en una variedad de procesos fisiológicos, la mayoría de estos procesos parecen ser sensibles a la organización espacio-temporal de los aumentos

de Ca^{2+} intracelular (Dupont, 2014). Fue por ello, que al realizar los análisis anteriores y apreciar que la intensidad de la fluorescencia no era uniforme al interior de la célula (figura 14), se decidió realizar análisis cuantitativos y cualitativos.

En los registros se observó como el núcleo mostraba una intensidad diferente al resto de la célula y esta dependía del grupo experimental. En los grupos control, el núcleo se mostró mayor intensidad de fluorescencia, mientras que en los tratados con CoCl_2 se vio con menor intensidad que el resto de la célula (figura 14).

Esto se analizó en primera instancia en la figura 15, en donde se muestran células representativas de los grupos al momento de la máxima respuesta al ser estimuladas con ATP y UTP a $[100] \mu\text{M}$. Para esta figura, se trazó una línea (en rojo) que va de un extremo a otro de la célula pasando por el núcleo y por medio del software Image J. Se obtuvo una representación numérica de los píxeles a lo largo de la línea, los cuales se muestran en las gráficas en UAF (en el eje y), siendo el eje x la longitud de la línea roja. De esta manera, las gráficas nos permiten visualizar la diferencia de la intensidad de la fluorescencia a lo largo de la célula.

A partir de este análisis podemos reafirmar lo observado en un inicio, los grupos control muestran una mayor intensidad de la fluorescencia en sus núcleos, siendo el punto máximo (de UAF) en la curva el que se relaciona con el segmento nuclear de la célula, mientras que en los extremos de la curva se muestra un decremento de la fluorescencia, los cuales son regiones de la curva que representan segmentos del citoplasma. Este patrón se observa de manera más pronunciada en el grupo control estimulado con ATP, sin embargo, también se observa en las células estimuladas con UTP.

En el caso de algunas células tratadas con CoCl_2 se observan picos en las gráficas que muestran una mayor intensidad de la fluorescencia en segmentos que rodean al núcleo (perinuclear), lo que podría estar indicando una mayor $[\text{Ca}^{2+}]$ en el retículo endoplásmico u otros organelos. Mientras que la fluorescencia del núcleo no varía en comparación con la del citoplasma.

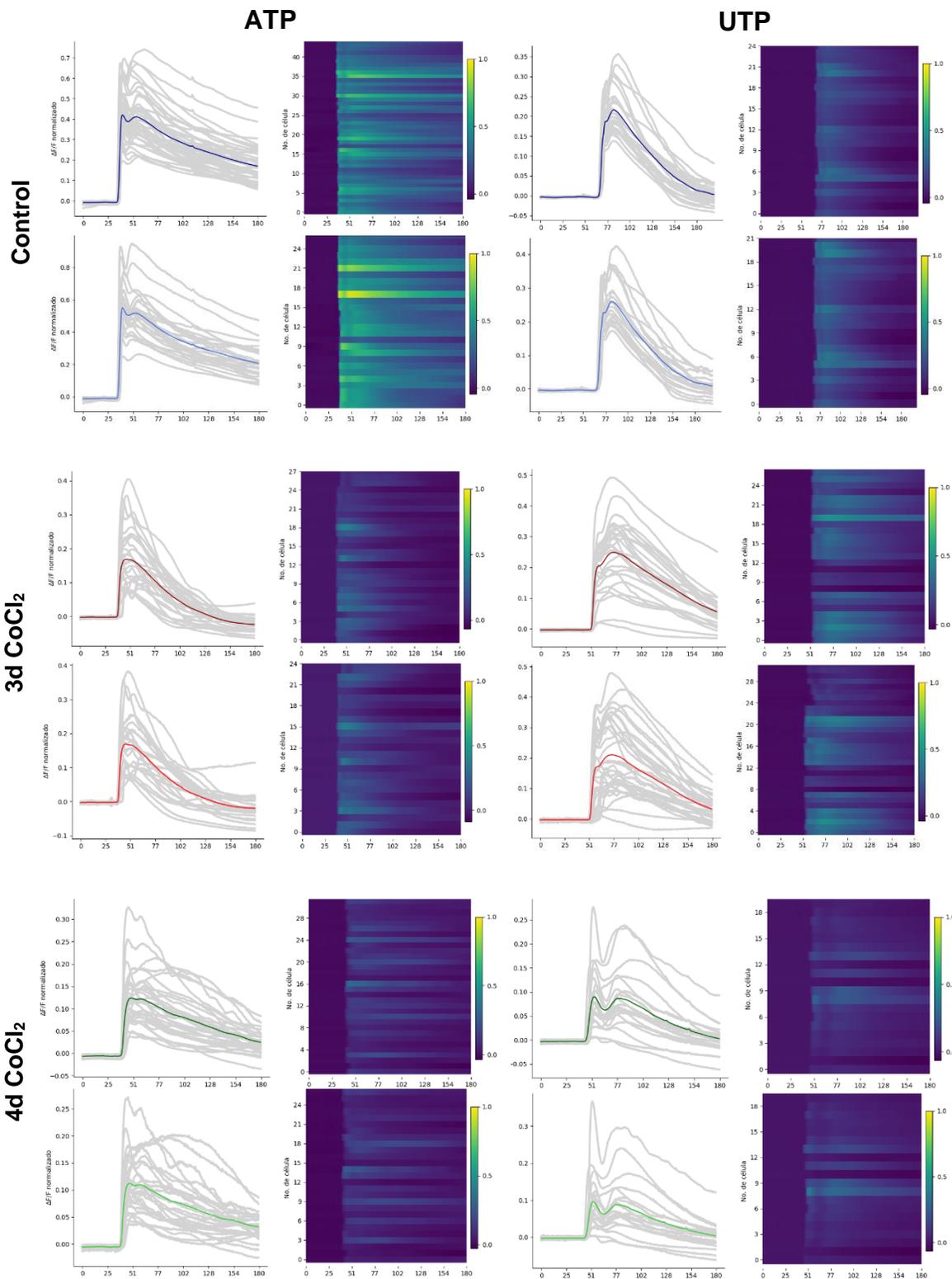


Figura 16. Trazos representativos del ΔF a través del tiempo en núcleos y células completas

Las gráficas y los mapas de calor muestran el ΔF a través del tiempo tras la estimulación con ATP (panel izquierdo) y UTP (panel derecho) que ocurrieron en las células (tonos oscuros) y sus núcleos (tonos claros), en las condiciones control y con tratamiento de CoCl₂ durante 3 y 4 días.

Continuando con el análisis de los núcleos e interesados en conocer si el patrón de respuesta en relación con el tiempo variaba con el de la célula completa, se delimitó manualmente el área de cada núcleo de las células registrada y tras aplicar los mismos análisis y tratamientos que se aplicaron a las células completas, se obtuvo el comportamiento del ΔF de estos.

En las gráficas de la figura 16 se muestran trazos (en gris) y su media (azul, rojo o verde), de registros representativos con sus respectivos mapas de calor, que ilustran el ΔF a lo largo del tiempo (s) en las células (tonos oscuros) y sus núcleos (tonos claros).

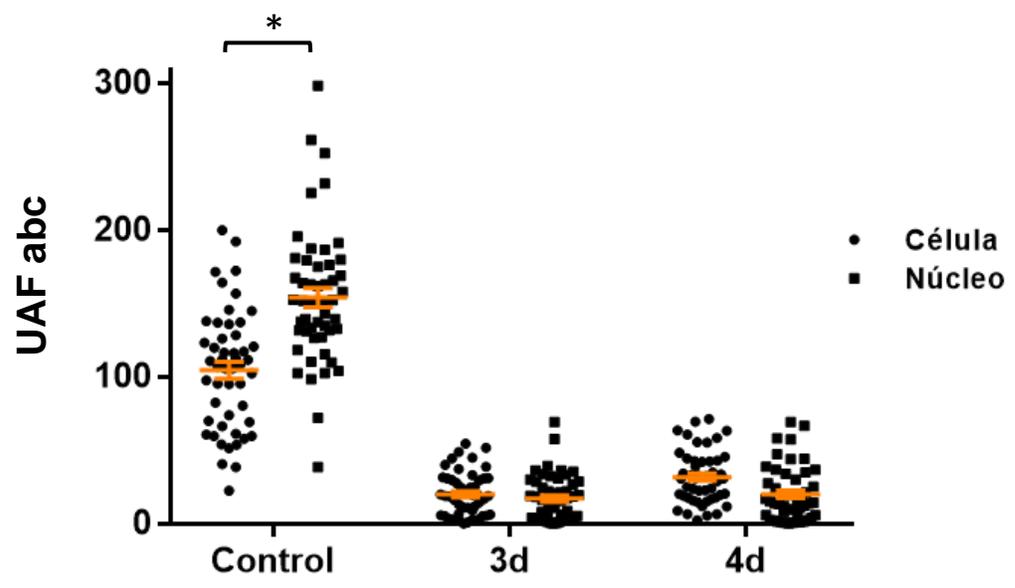
Con estas imágenes podemos observar como a pesar de la diferencia en la intensidad de la fluorescencia entre el núcleo y el resto de la célula en algunos grupos, el patrón de la respuesta a través del tiempo no se modifica.

Para determinar de manera cuantitativa el cambio en la intensidad de fluorescencia de los núcleos, se obtuvo el abc generada por la respuesta de cada célula y por cada núcleo en los diferentes grupos. Posteriormente se realizó un ANOVA y un test de Bonferroni tanto para los grupos estimulados con ATP, como para los grupos estimulados con UTP (figura 17).

Los resultados indicaron que los núcleos de las células estimuladas con ATP y UTP mostraron una intensidad en la fluorescencia significativamente mayor ($p < 0.0001$) en comparación con la intensidad de la fluorescencia de las células completas únicamente en la condición control. Mientras que en los grupos tratados con CoCl_2 estimulados con ATP y UTP no se obtuvieron diferencias significativas.

Lo que podría indicar que en las células SKOV-3 en condiciones control, hay vías de señalización que llegan al núcleo y que permiten la entrada de Ca^{2+} al interior de este, generando que la $[\text{Ca}^{2+}]$ nuclear sea significativamente mayor que la $[\text{Ca}^{2+}]$ del citoplasma. A diferencia de las células tratadas con CoCl_2 durante 3 y 4 días, en donde no se observa el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el núcleo.

ATP



UTP

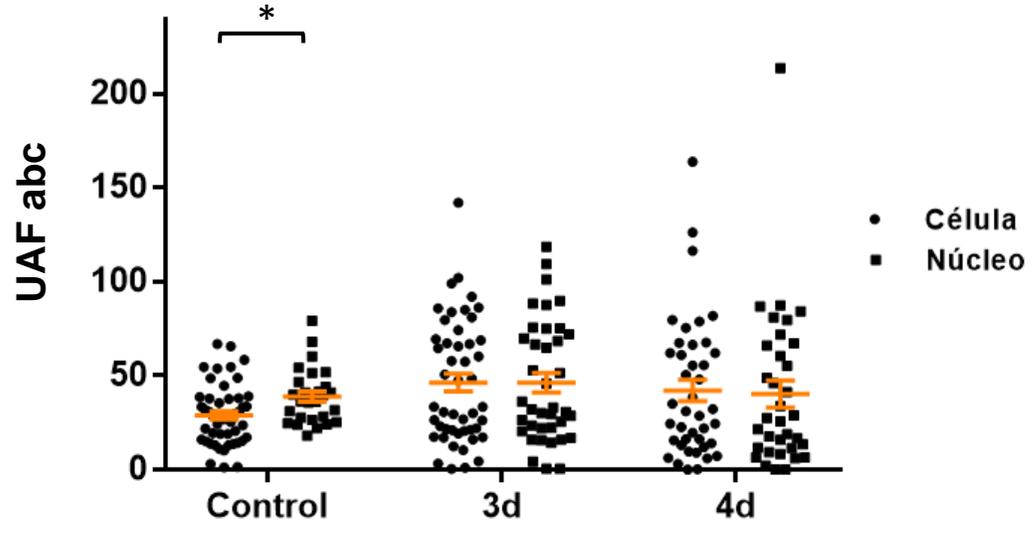


Figura 17. Comparación del abc de células completas vs sus núcleos.

Las gráficas muestran el Mx F tras la estimulación de los agonistas purinérgicos determinado a partir del abc generada por la respuesta de cada una de las células y los núcleos registrados. En el panel superior observamos el abc de las células y los núcleos de cada grupo experimental (control, 3 y 4 días de tratados con CoCl_2) estimulados con ATP. La intensidad de la fluorescencia de los núcleos del grupo control es significativamente mayor (ANOVA y test de Bonferroni, $p < 0.0001$) que la intensidad de la fluorescencia de la célula completa. En el panel inferior observamos el abc de las células y los núcleos de cada grupo experimental estimulados con UTP. La intensidad de la fluorescencia de los núcleos es significativamente mayor (ANOVA y test de Bonferroni, $p < 0.0001$) que la intensidad de la fluorescencia de la célula completa únicamente en el grupo control.

DISCUSIÓN

Modelo experimental de CCGP

Dentro de las teorías del cáncer, una de las que ha cobrado mayor fuerza en los últimos años es la propuesta de la existencia de las CIT, a las cuales se les ha atribuido la capacidad de iniciar y desarrollar el crecimiento de tumores, ser resistentes ante los tratamientos quimioterapéuticos y causar recurrencia y metástasis del cáncer. (Al-Alem, et al. 2019, Moitra, 2015; Wang, 2015; Hedditch et al., 2014; Rahman, et al., 2011; O'Brien et al., 2009; Jordan et al., 2006).

A partir del estudio de las CIT, se ha descrito la presencia de grandes células cancerosas atípicas con múltiples copias de ADN, a las que se les ha denominado CCGP, las cuales se propone se originan a partir de fallas repetidas de mitosis o como productos intermedios de inestabilidad genómica que caracterizan por su gran tamaño (de 3 a 10 veces más grandes que las células cancerosas normales) y su núcleo gigante (Zhang et al, 2014).

El primer objetivo del presente estudio fue obtener CCGP utilizando como estímulo el CoCl_2 , los datos obtenidos sugieren que el cultivo de células SKOV-3 presenta un enriquecimiento en CCGP, estas evidencias son:

- 1) El tamaño del eje mayor del núcleo de células tratadas con CoCl_2 es significativamente más grande (figura 6). La formación de las CCGP se observó desde el tercer día con el tratamiento, el tamaño de los núcleos fue significativamente mayor (ANOVA y test de Bonferroni, $p < 0.0001$ para 3 y 5 días, $p < 0.001$ para 4 días, 150 núcleos por grupo) en las tres condiciones del tratamiento en comparación con el grupo control, sin embargo, a los tres días de tratamiento los núcleos alcanzaron el mayor tamaño, aumentando en promedio $3.377 \mu\text{M} \pm 0.52$.
- 2) El análisis de los transcritos que codifican para marcadores de la EMT, por RT PCR, mostraron que *CDH1* disminuye con el tratamiento, mientras que *SNAIL* sólo está presente en las células tratadas con CoCl_2 (Figura 7).
- 3) Las células estimuladas con CoCl_2 expresan la glicoproteína CD133, el marcador más conspicuo de las células troncales de cáncer (Figura 8).

Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros estudios como el de Rohnalter y colaboradores, en el que reportaron el enriquecimiento de CCGP en el cultivo celular de SKOV-3 posterior al tratamiento con platino, así como la expresión de marcadores de troncalidad y de EMT en las CCGP obtenidas (Rohnalter, et al., 2015). De igual manera Zhang y colaboradores reportaron la expresión de estos marcadores en CCGP derivadas de tumores sin tratamiento farmacológico (Zhang et al, 2014).

Expresión e identidad de los receptores purinérgicos en células SKOV-3 intactas

Como segundo objetivo se identificó la expresión de receptores purinérgicos en células SKOV-3 control, lo que nos sugirió evidencia farmacológica de su expresión.

La estimulación con ATP en las células SKOV-3 control indujo una respuesta monofásica inmediata que se sostiene unos 3 segundos en valores máximos y baja paulatinamente. La amplitud máxima de dicha respuesta fue de 1.53 UAF mayor a la fluorescencia basal (tabla 3), siendo la mayor respuesta observada entre las diferentes condiciones experimentales, indicando la presencia de receptores purinérgicos. La expresión de receptores P2 en células SKOV-3 observada concuerda con la de resultados reportados previamente (Lara-Mejía, 2012).

La estimulación con ATP mostró la respuesta de más de una población de receptores P2 en las células SKOV-3 control. La curva CR sigmoide bifásica que se muestra en la figura 10 nos permite inferir que posiblemente una subpoblación de receptores P2 están respondiendo a la estimulación con concentraciones bajas de ATP y generando una primer EC_{50} , mientras que otra subpoblación de receptores P2 responde a la estimulación con concentraciones altas de ATP, generando así una segunda EC_{50} (tabla 3). Por otra parte, la estimulación con UTP permitió identificar la expresión de receptores P2Y₂ y/o P2Y₄ en las SKOV-3 control. El MxF generado con la estimulación de UTP fue significativamente menor ($p < 0.0001$) al generado por la estimulación con ATP, lo que podría indicar que la respuesta registrada por la estimulación con ATP involucra a los receptores P2Y₂ y/o P2Y₄ y a otra subpoblación de receptores P2 (Figura 11).

Expresión e identidad de los Receptores Purinérgicos en CCGP

Como se mencionó previamente, se ha demostrado la participación de receptores P2 en la inducción al proceso de EMT (Mártínez-Ramírez et al., 2016; Lamarca et al., 2014; Vázquez-Cuevas, et al., 2014; Xie et al., 2014, Li et al., 2013). Sin embargo, no hay evidencia previa de la actividad de receptores purinérgicos en CCGP.

El siguiente objetivo del presente estudio fue identificar la expresión de receptores P2 en CCGP por medio de la estimulación con agonistas purinérgicos. Los resultados obtenidos evidenciaron la expresión de receptores P2 en las CCGP de la siguiente manera:

1) La estimulación con ATP produjo incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, revelando la expresión de receptores P2 en las CCGP generadas con $CoCl_2$. Y al igual que en la condición control, las curvas CR (figura 10) mostraron la posible participación de más de una población de receptores purinérgicos que responden de manera diferencial ante las diferentes concentraciones de ATP, sin embargo los valores de las EC50 sugieren que hay cambios en la identidad de los receptores, aspecto que debe ser explorado con experimentos farmacológicos específicos o bien con el análisis de los transcritos que codifican para los receptores purinérgicos en cada grupo experimental.

2) Es importante resaltar que hubo una disminución significativa ($p < 0.0001$) en la magnitud de la respuesta registrada al estimular con ATP en comparación con el grupo control (figura 11). Esto podría deberse a que algunos receptores purinérgicos se regulan a la baja, ya sea transcripcionalmente o a otro nivel. O bien porque algún mecanismo bioquímico como la internalización, disminuya su número efectivo en la membrana.

Debido a que el principal blanco del tratamiento con $CoCl_2$ es la estabilización de HIF-1 α , pensamos que estos efectos podrían estar relacionados con la expresión de dicho factor de transcripción. Estudios recientes han demostrado que las vías de señalización de HIF-1 α y Ca^{2+} se superponen en varios puntos del cáncer. Por ejemplo, se ha demostrado que los canales y bombas de Ca^{2+} son reguladores de HIF-1 α en diferentes etapas de su mecanismo de expresión y de acción, incluida la transcripción, traducción, estabilización o translocación nuclear en diversos tipos de cáncer (Azimi, et al., 2017).

Por otro lado, HIF-1 controla la transcripción de varios moduladores de calcio, como canales, bombas, receptores y sensores, lo que puede resultar en la reestructuración de la señal de calcio. Muestra de ello es el estudio realizado por Azimi y colaboradores, en el que demostraron que el silenciamiento de HIF-1 α inhibe la regulación positiva del canal de calcio potencial receptor transitorio C1 (TRPC1) en células basales de cáncer de mama. Este estudio también mostró que TRPC1 promovió la inducción de la EMT a través de la regulación de los cambios en SNAIL (Azimi, et al., 2017).

De igual manera, se ha reportado que, en las células del carcinoma hepatocelular HepG2, HIF-1 α controla la expresión del sensor de Ca²⁺ del retículo endoplásmico, molécula de interacción estromal-1 (STIM1), durante la hipoxia, lo que da como resultado una entrada de Ca²⁺ operada por el almacén y mejorada por la hipoxia (Li et al., 2015).

3) Por otro lado, la estimulación con UTP también indujo incremento en la [Ca²⁺]_i, muy probablemente por la activación de los receptores P2Y₂ y P2Y₄ en las CCGP generadas con CoCl₂. Pero no se observaron diferencias significativas en la magnitud de la respuesta con respecto al grupo control (figura 11), lo que indica que la regulación de estos receptores se mantiene a pesar del estímulo con CoCl₂, resultado que discrepa con lo reportado previamente en células tubulares renales primarias humanas, donde se observó que HIF-1 α activa directamente la expresión del receptor P2Y₂ (Krauss, et al., 2016).

A partir de estos resultados y en comparación a lo observado en la estimulación con ATP, podemos inferir que es una población de receptores diferente a los P2Y₂ y/o P2Y₄ la que está siendo regulada a la baja con el tratamiento de CoCl₂.

Es importante mencionar que pesar de haber podido identificar la actividad de los receptores P2Y₂ y P2Y₄, aún no nos es posible diferenciar entre la participación de cada uno de estos dos tipos de receptores, para lo que se tiene pensado en futuros experimentos el uso de fármacos antagonistas selectivos para estos receptores, de tal manera que se pueda visualizar específicamente la participación de cada uno de ellos.

4) A pesar de no observarse un cambio significativo en la magnitud de la respuesta de las células tratadas con CoCl₂ al ser estimuladas con UTP, se registró un incremento de la EC₅₀ (tabla 3)

en comparación con el grupo control, lo que revela una menor afinidad, lo que podría explicarse por una regulación diferencial de alguno de los 2 subtipos (P2Y₂ o P2Y₄) o al cambio en interacciones proteína-proteína producidas por el tratamiento con CoCl₂, por ejemplo la formación o el desensamblaje de dímeros u otros multímeros, rasgo característico de la Clase A de GPCRs.

Al comparar las EC₅₀ con las obtenidas tras el estímulo con ATP bajo la misma condición experimental, se podría proponer que estos receptores son la población que están respondiendo a concentraciones altas de ATP, mientras que la otra población de receptores no identificada es la que responde a concentraciones menores de ATP en condiciones de estímulo con CoCl₂, ya que en condiciones control la EC₅₀ al estimular con UTP es más cercana a la EC₅₀ obtenida con la estimulación de concentraciones bajas de ATP.

Dinámica intracelular de Ca²⁺

En cuanto a la dinámica de la [Ca²⁺]_i, se sabe que sus cualidades cuantitativas y cualitativas varían de acuerdo con el tipo de célula, e incluso en una misma célula el comportamiento del Ca²⁺ se modifica con base al agonista con que se esté estimulando. Sin embargo, debido a la relevancia de la participación de Ca²⁺ en la transducción de señales y su papel crucial en una variedad de procesos fisiológicos, el interés por entender los procesos sensibles a la organización espacio-temporal de los aumentos de Ca²⁺ intracelular se encuentra latente en las investigaciones (Dupont, 2014).

A pesar de las diferencias en la dinámica de Ca²⁺ de acuerdo con las características y condiciones de las células, se ha propuesto de manera general que, en células en reposo la concentración de Ca²⁺ es baja (30 a 100 nM) en el citosol y alta en el retículo endoplásmico (0,5 a 1 mM). Este enorme gradiente de concentración permite un rápido aumento del Ca²⁺ citosólico tras la apertura de los receptores IP₃ y rianodina, que son canales de Ca²⁺ ubicados específicamente en la membrana del retículo endoplásmico. Estos canales juegan un papel principal en la señalización celular. Por otro lado, el mantenimiento de estos gradientes requiere un bombeo de Ca²⁺ muy activo, dependiente de ATP (Dupont, 2014), sin embargo, no hay mucha información reportada acerca de los cambios en la [Ca²⁺]_i en organelos como el núcleo.

En el presente estudio, se identificaron por medio del ΔF diferencias en la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ entre las células SKOV-3 control y las tratadas con $CoCl_2$, las evidencias obtenidas fueron las siguientes:

1) Se observó un aumento significativo ($p < 0.0001$) en la fluorescencia de los núcleos en comparación a la fluorescencia de las células completas SKOV-3 control tras la estimulación con ATP y UTP (figura 17).

2) No se obtuvieron diferencias significativas entre la fluorescencia del núcleo y la fluorescencia de la célula completa en las células tratadas con $CoCl_2$ tras la estimulación con ATP y UTP (figura 17).

Estas observaciones sugieren que el tratamiento con $CoCl_2$ puede modificar las respuestas celulares medidas Ca^{2+} intracelular, por ejemplo, la expresión génica, por tanto, esta observación abre cauces interesantes para futuras investigaciones.

Si bien los mecanismos activados en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ son promovidos por la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, mediante la vía canónica $G\alpha_q$ -PLC mediada por IP3 (Abbracchio et al., 2006), no se descarta la posible participación de influjo de Ca^{2+} , por ejemplo, a través de la vía de entrada de Ca^{2+} , en la que se es dependiente del vaciado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} (Putney, 2005). La participación de esta vía podría estar presente a juzgar por la prolongada respuesta de los transitorios de calcio observada.

Esta respuesta prolongada de los transitorios de Ca^{2+} registrada, muestra diferencias temporales con transitorios de Ca^{2+} registrados en otros tipos de células en el ovario, como se reportó en las células teca estimuladas con UTP en las mismas concentraciones, siendo que los transitorios de estas últimas tienen una menor duración. En el caso de la respuesta de Ca^{2+} en las células teca, se ha reportado la participación de la vía canónica $G\alpha_q$ -PLC (Vázquez-Cuevas et al., 2010), por lo que existe la posibilidad de la participación de una vía alternativa que regule $[Ca^{2+}]_i$ en las células SKOV-3 y que esté involucrada en el aumento significativo de la $[Ca^{2+}]_i$ en los núcleos de estas células al ser estimuladas con agonistas purinérgicos.

Con esto proponemos que el tratamiento con $CoCl_2$ modifica las características de la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ de las células SKOV-3, lo que podría estarse reflejando en cambios en la

transducción de señales en las CCGP, sin embargo, es necesario realizar más experimentos para confirmar esta información.

CONCLUSIONES

1. El tratamiento farmacológico con CoCl_2 en cultivos de células SKOV-3 derivadas de carcinoma ovárico, induce el enriquecimiento de células con características de CCGP como núcleos de mayor tamaño y expresión de marcadores de la EMT y de troncalidad.
2. La línea celular SKOV-3 expresa receptores purinérgicos responsivos a ATP y a UTP, el carácter bifásico de la curva CR en respuesta a ATP reveló 2 poblaciones farmacológicas; mientras que para UTP se detectó una población.
3. Las células SKOV-3 control tiene una respuesta significativamente mayor a ATP que a UTP, lo que sugiere la expresión de más de una población de receptores purinérgicos, incluyendo a los P2Y_2 y/o P2Y_4 .
4. Las células SKOV-3 tratadas con CoCl_2 disminuyeron significativamente su respuesta de incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta al ATP, y mantuvieron su respuesta ante la estimulación de UTP, en comparación con sus grupos control, lo que permite sugerir que los receptores P2Y_2 y/o P2Y_4 mantienen su regulación, pero otros subtipos de receptores de esta familia son expresados diferencialmente en ambas condiciones.
5. La duración de la respuesta de los transitorios de Ca^{2+} de las células SKOV-3 es prolongada en comparación con la de otras células del ovario (Vázquez-Cuevas et al., 2010). Por lo que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las células SKOV-3 estimuladas con ATP y UTP, probablemente no estén reguladas únicamente por la vía canónica $\text{G}\alpha\text{q}$ -PLC mediada por IP_3 . Si no que también se encuentre participando algún mecanismo alternativo de regulación de Ca^{2+} , como la vía de entrada capacitativa de Ca^{2+} .
6. Hay un incremento significativo de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en los núcleos de las células SKOV-3 control ante la estimulación de ATP y UTP, que no se registra en las células tratadas con CoCl_2 , lo cual puede implicar diferencias en la regulación de la expresión génica. Esto nos nos lleva a proponer que existe una vía de señalización conformada por

HIF-1 α y los receptores purinérgicos que participa regulación de la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ de las CCGP en comparación con las SKOV-3 control.

PERSPECTIVAS

Las observaciones generadas en el presente proyecto, aunque iniciales, abren un amplio panorama; a continuación, se enlistan algunas perspectivas generales que deben ser abordadas experimentalmente.

- Los datos farmacológicos sugieren que las CCGP derivadas de células SKOV-3 expresan receptores purinérgicos P2Y, identificar molecularmente y caracterizar la respuesta de los subtipos de estos receptores purinérgico con detalle contribuirá al entendimiento de las CCGP en el cáncer.
- Estudiar el fenotipo y la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ dependiente del sistema purinérgico, en las CCGP posterior al tratamiento con $CoCl_2$ en condiciones normales de cultivo, esto permitirá proponer si el fenotipo CCGP es un estado de transición que permite enfrentar condiciones de estrés y posteriormente orquestar el crecimiento y diseminación de las células tumorales.
- El entendimiento de los cambios de fluorescencia en el núcleo en células SKOV-3 y en células CCGP podrían brindar información relevante de la participación de los receptores purinérgicos y su efecto en las señales de transducción al en la célula, sería de gran interés un estudio transcriptómico en este contexto.

REFERENCIAS

1. Abbracchio M, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight G, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson K, Weisman G. (2006). International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev.* 58:281–341. doi: 10.1124/pr.58.3.3.
2. Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Verkhratsky, A., & Zimmermann, H. (2009). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in neurosciences*, 32(1), 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.10.001>
3. Amoroso, F., Capece, M., Rotondo, A., Cangelosi, D., Ferracin, M., Franceschini, A., Raffaghello, L., Pistoia, V., Varesio, L., & Adinolfi, E. (2015). The P2X7 receptor is a key modulator of the PI3K/GSK3 β /VEGF signaling network: evidence in experimental neuroblastoma. *Oncogene*, 34(41), 5240–5251. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.444>
4. Appert-Collin, A., Hubert, P., Cr emel, G., & Bennisroune, A. (2015). Role of ErbB receptors in cancer cell migration and invasion. *Frontiers in pharmacology*, 6, 283.
5. Al-Alem, L. F., Pandya, U. M., Baker, A. T., Bellio, C., Zarrella, B. D., Clark, J., DiGloria, C. M., & Rueda, B. R. (2019). Ovarian cancer stem cells: What progress have we made? *The international journal of biochemistry & cell biology*, 107, 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.12.010>
6. al-Rashida, M., & Iqbal, J. (2014). Therapeutic potentials of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase, ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase, ecto-5'-nucleotidase, and alkaline phosphatase inhibitors. *Medicinal research reviews*, 34(4), 703–743. <https://doi.org/10.1002/med.21302>
7. Auersperg, N., Wong, A. S., Choi, K., Kang, S. K., Leung, P. C., (2001). Ovarian Surface Epithelium: Biology, Endocrinology, and Pathology, *Endocrine Reviews*, Volume 22, Issue 2, 1 255–288.
8. Azimi I. (2018). The interplay between HIF-1 and calcium signalling in cancer. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 97, 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.02.001>
9. Bapat, S. A., Mali, A. M., Koppikar, C. B., & Kurrey, N. K. (2005). Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. *Cancer research*, 65(8), 3025-3029.
10. Borcar, A., Menze, M. A., Toner, M., & Hand, S. C. (2013). Metabolic preconditioning of mammalian cells: mimetic agents for hypoxia lack fidelity in promoting phosphorylation of pyruvate dehydrogenase. *Cell and tissue research*, 351(1), 99–106. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1517-2>
11. Burnstock, G. (2016). P2X ion channel receptors and inflammation. *Purinergic Signalling*. Springer Netherlands 12:59. doi/10.1007/s11302-015-9493-0.

12. Burnstock, G. & Di Virgilio, F. (2013). Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signal*. 9, 491–540.
13. Burnstock, G., Fredholm, B. B., North, R. A., & Verkhratsky, A. (2010). The birth and postnatal development of purinergic signalling. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 199(2), 93–147. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02114.x>
14. Burnstock, G., & Verkhratsky, A. (2010). Long-term (trophic) purinergic signalling: purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death. *Cell death & disease*, 1(1).
15. Campos-Contreras, A., Díaz-Muñoz, M., & Vázquez-Cuevas, F. G. (2020). Purinergic Signaling in the Hallmarks of Cancer. *Cells*, 9(7), 1612. <https://doi.org/10.3390/cells9071612>
16. Cepeda, V., Fuertes, M. A., Castilla, J., Alonso, C., Quevedo, C., & Pérez, J. M. (2007). Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 7(1), 3–18. <https://doi.org/10.2174/187152007779314044>
17. Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Iovino, F., Wicinski, J., Cervera, N., Finetti, P., Hur, M. H., Diebel, M. E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Viens, P., Xerri, L., Bertucci, F., Stassi, G., Dontu, G., Birnbaum, D., & Wicha, M. S. (2009). Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer research*, 69(4), 1302–1313. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2741>
18. Chen, K., Huang, Y. & Chen, J. (2013). Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacol Sin* 34, 732–740 [doi:10.1038/aps.2013.27](https://doi.org/10.1038/aps.2013.27)
19. Cortez, A.J., Tudrej, P., Kujawa, K.A. et al. (2018). *Cancer Chemother Pharmacol*. 81: 17. doi.org/10.1007/s00280-017-3501-8.
20. De Ita, M., Vargas, M.H., Carbajal, V., Ortiz-Quintero, B., López-López, C., Miranda-Morales, M., Barajas-López, C., and Montañón, L.M. (2016). ATP releases ATP or other nucleotides from human peripheral blood leukocytes through purinergic P2 receptors. *Life Sci*. 145, 85 –9
21. Di Virgilio, F., Dal Ben, D., Sarti, A. C., Giuliani, A. L. & Falzoni, S. (2017). The P2X7 receptor in infection and inflammation. *Immunity* 47, 15–31.
22. Di Virgilio, F., Sarti, A. C., Falzoni, S., De Marchi, E., & Adinolfi, E. (2018). Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. *Nature reviews. Cancer*, 18(10), 601–618. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0037-0>
23. du Bois, A., Reuss, A., Pujade-Lauraine, E., Harter, P., Ray-Coquard, I., & Pfisterer, J. (2009). Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer*, 115(6), 1234–1244. <https://doi.org/10.1002/cncr.24149>

24. Dupont G. (2014). Modeling the intracellular organization of calcium signaling. Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine, 6(3), 227–237. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1261>
25. Ferrandina, G., Bonanno, G., Pierelli, L., Perillo, A., Procoli, A., Mariotti, A., Corallo, M., Martinelli, E., Rutella, S., Paglia, A., Zannoni, G., Mancuos, S. y Scambia, G. (2008), Expression of CD133-1 and CD133-2 in ovarian cancer. International Journal of Gynecological Cancer, 18: 506-514. doi:10.1111/j.1525-1438.2007.01056.
26. Gallardo-Rincón D, et al. (2011). Tercer Consenso Nacional de Cáncer de Ovario 2011. Rev Invest Clin Inv t i; 63 (6): 665-702.
27. Gillet J. P. & Gottesman M. M. (2010) Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer. In: Zhou J. (eds) Multi-Drug Resistance in Cancer. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 596. Humana Press.
28. Giuliani, A. L. et al. (2014). Trophic activity of human P2X7 receptor isoforms A and B in osteosarcoma. PLOS ONE 9, e107224.
29. Godde, N.J., Galea, R.C., Elsum, I.A., and Humbert, P.O. (2010). Cell polarity in motion: redefining mammary tissue organization through EMT and cell polarity transitions. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 15, 149–168.
30. Hedditch, E. L., Gao, B., Russell, A. J., Lu, Y., Emmanuel, C., Beesley, J., ... & Henderson, M. J. (2014). ABCA transporter gene expression and poor outcome in epithelial ovarian cancer. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 106(7).
31. Heddleston, JM, Li, Z., McLendon, RE, Hjelmeland, AB y Rich, JN (2009). El microambiente hipóxico mantiene las células madre del glioblastoma y promueve la reprogramación hacia un fenotipo de células madre cancerosas. Ciclo celular (Georgetown, Texas), 8 (20), 3274–3284. <https://doi.org/10.4161/cc.8.20.9701>
32. Jelovac, D. & Armstrong, D. K. (2011). Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 61: 183-203. doi:10.3322/caac.20113
33. Jordan, C. T., Guzman, M. L., y Noble, M. (2006). Cancer Stem Cells. New England Journal of Medicine. 355:1253-1261 doi: 10.1056/NEJMra061808.
34. Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. The Journal of clinical investigation, 119(6), 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>
35. Karst, A. M. & Drapkin, R. (2010). Ovarian Cancer Pathogenesis: A Model in Evolution Journal of Oncology doi:10.1155/2010/932371.
36. Keith, B., & Simon, M. C. (2007). Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. Cell, 129(3), 465–472. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.019>
37. Kepp, O., Loos, F., Liu, P. & Kroemer, G. (2017). Extracellular nucleosides and nucleotides as immunomodulators. Immunol. Rev. 280, 83–92.

38. Kossaï, M., Leary, A., Scoazec, J. Y., & Genestie, C. (2018). Ovarian Cancer: A Heterogeneous Disease. *Pathobiology: journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, 85(1-2), 41–49.
39. Kong D, Li Y, Wang Z, Sarkar FH. 2011. Cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition (emt)-phenotypic cells: Are they cousins or twins? *Cancers* 3: 716– 729.
40. Kraus, A., Grampp, S., Goppelt-Struebe, M., Schreiber, R., Kunzelmann, K., Peters, D. J., Leipziger, J., Schley, G., Schödel, J., Eckardt, K. U., & Buchholz, B. (2016). P2Y2R is a direct target of HIF-1 α and mediates secretion-dependent cyst growth of renal cyst-forming epithelial cells. *Purinergic signalling*, 12(4), 687–695. <https://doi.org/10.1007/s11302-016-9532-5>
41. Kurman, R. J., & Shih, I. (2011). Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Human pathology*, 42(7), 918–931. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2011.03.003>
42. Lamarca, A., Gella, A., Marti nez, T., Segura, M., Figueiro-Silva, J., Grijota-Martinez, C., Trullas, R., and Casals, N. (2014). Uridine 5'-triphosphate promotes in vitro Schwannoma cell migration through matrix metalloproteinase-2 activation. *PLoS One* 9, e98998.
43. Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(3), 178-196.
44. Lara-Mejía, A. (2012). Expresión de los receptores purinérgicos P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₆ en las células normales y transformadas del epitelio superficial ovárico de mamífero. Universidad Nacional Autónoma de México.
45. Li, Y., Guo, B., Xie, Q., Ye, D., Zhang, D., Zhu, Y., ... & Zhu, B. (2015). STIM1 mediates hypoxia-driven hepatocarcinogenesis via interaction with HIF-1. *Cell reports*, 12(3), 388-395.
46. Li, H., Xu, F., Li, S., Zhong, A., Meng, X., and Lai, M. (2016). The tumor microenvironment: An irreplaceable element of tumor budding and epithelial-mesenchymal transition-mediated cancer metastasis. *Cell Adhes. Migr.* 1–13.
47. Liu, J. & Matulonis U. A. (2010). New Advances in Ovarian Cancer. *Ovarian Cancer, Gynecologic Cancers, Oncology Journal*.24, 8.
48. Luo, X., Dong, Z., Chen, Y., Yang, L. y Lai, D. (2013). Enrichment of ovarian cancer stem-like cells is associated with epithelial to mesenchymal transition through an miRNA-activated AKT pathway. *Cell Prolif.*, 2013, 46, 436–446.
49. Malpica, A., Deavers, M. T., Lu, K., Bodurka, D. C., Atkinson, E. N., Gershenson, D. M., & Silva, E. G. (2004). Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system. *The American journal of surgical pathology*, 28(4), 496–504. <https://doi.org/10.1097/00000478-200404000-00009>
50. Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., Campbell, L. L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J., & Weinberg, R.

- A. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133(4), 704–715. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>
51. Martínez-Ramírez, A. S., Garay, E., García-Carrancá, A., Vázquez-Cuevas, F. G. (2015). The P2RY2 Receptor Induces Carcinoma Cell Migration and EMT Through Cross-Talk With Epidermal Growth Factor Receptor. *Journal of Cellular Biochemistry* 117:1016–1026.
52. Martínez-Ramírez, A.S. & Vázquez-Cuevas, F.G. (2015), Purinergic signaling in the ovary. *Mol. Reprod. Dev.*, 82: 839-848. doi:10.1002/mrd.22537
53. Moitra, K. (2015). Overcoming multidrug resistance in cancer stem cells. *BioMed research international*, 2015.
54. Mungai PT, Waypa GB, Jairaman A, Prakriya M, Dokic D, Ball MK, Schumacker PT. Hypoxia triggers AMPK activation through reactive oxygen species-mediated activation of calcium release-activated calcium channels. *Mol Cell Biol*. 2011 Sep;31(17):3531-45. doi: 10.1128/MCB.05124-11. Epub 2011 Jun 13. PMID: 21670147; PMCID: PMC3165558.
55. Muñoz-Sánchez, J., & Chánez-Cárdenas, M. E. (2019). The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *Journal of applied toxicology: JAT*, 39(4), 556–570. <https://doi.org/10.1002/jat.3749>
56. National Academies of Sciences, Engineering and Medicine. 2016. *Ovarian cancers: Evolving paradigms in research and care*. Washington, DC: The National Academies Press. doi: 10.17226/21841.
57. Navarro-Tableros, V., Fiordeliso, T., Hernández-Cruz, A. & Marcia Hiriart. (2007). Physiological development of insulin secretion, calcium channels, and GLUT2 expression of pancreatic rat β -cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2007 292:4, E1018-E1029
58. Normanno N, De Luca A, Maiello MR, Campiglio M, Napolitano M, Mancino M, Carotenuto A, Viglietto G, Menard S. 2006. The MEK/MAPK pathway is involved in the resistance of breast cancer cells to the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib. *J Cell Physiol* 207: 420– 427.
59. O'Brien, C. A., Kreso, A., Dick, J. E. (2009). Cancer Stem Cells in Solid Tumors: An Overview. *Seminars in Radiation Oncology*, 19, 2, 71-77.
60. Ottevanger, P. B. (2017). Ovarian cancer stem cells more questions than answers. *Seminars in Cancer Biology* 44, 67–71.
61. Pellegatti, P., Raffaghello, L, Bianchi, G, Piccardi, F, Pistoia, V, et al. (2008). Increased Level of Extracellular ATP at Tumor Sites: In Vivo Imaging with Plasma Membrane Luciferase. *PLOS ONE* 3(7): e2599.doi.org/10.1371/journal.pone.0002599.
62. Pouysségur, J., Dayan, F., & Mazure, N. M. (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*, 441(7092), 437–443. <https://doi.org/10.1038/nature04871>
63. Putney, J. W., Jr., (2005). Capacitative calcium entry: sensing the calcium stores. *J Cell Biol*, 169, (3), 381-2.

64. Rahman M, Deleyrolle L, Vedam-Mai V, Azari H, Abd-El-Barr M, Reynolds BA. The cancer stem cell hypothesis: failures and pitfalls. *Neurosurgery*. 2011 Feb;68(2):531-45; discussion 545. doi: 10.1227/NEU.0b013e3181ff9eb5. PMID: 21135745.
65. Raval, R. R., Lau, K. W., Tran, M. G., Sowter, H. M., Mandriota, S. J., Li, J. L., Pugh, C. W., Maxwell, P. H., Harris, A. L., & Ratcliffe, P. J. (2005). Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Molecular and cellular biology*, 25(13), 5675–5686. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.13.5675-5686.2005>
66. Rohnalter, V., Roth, K., Finkernagel, F., Adhikary, T., Obert, J., Dorzweiler, K., Bensberg, M., Müller-Brüsselbach, S., & Müller, R. (2015). A multi-stage process including transient polyploidization and EMT precedes the emergence of chemoresistant ovarian carcinoma cells with a dedifferentiated and pro-inflammatory secretory phenotype. *Oncotarget*, 6(37), 40005–40025. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5552>
67. Sahlgren, C., Gustafsson, M. V., Jin, S., Poellinger, L., & Lendahl, U. (2008). Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(17), 6392–6397. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802047105>
68. Salvestrini, V., Orecchioni, S., Talarico, G., Reggiani, F., Mazzetti, C., Bertolini, F., Orioli, E., Adinolfi, E., Di Virgilio, F., Pezzi, A., Cavo, M., Lemoli, R. M., & Curti, A. (2017). Extracellular ATP induces apoptosis through P2X7R activation in acute myeloid leukemia cells but not in normal hematopoietic stem cells. *Oncotarget*, 8(4), 5895–5908. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13927>
69. Schult, G. & Fredholm B., (2003). Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal.*, 15, pp. 813-827
70. Steg, A. D., Bevis, K. S., Katre, A. A., Ziebarth, A., Dobbin, Z. C., Alvarez, R. D., Zhang, K., Conner, M., & Landen, C. N. (2012). Stem cell pathways contribute to clinical chemoresistance in ovarian cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18(3), 869–881. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2188>
71. Shackleton, M. (2010, April). Normal stem cells and cancer stem cells: similar and different. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 20, No. 2, pp. 85-92). Academic Press.
72. Synnestvedt, K., Furuta, G. T., Comerford, K. M., Louis, N., Karhausen, J., Eltzhig, H. K., Hansen, K. R., Thompson, L. F., & Colgan, S. P. (2002). Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *The Journal of clinical investigation*, 110(7), 993–1002. <https://doi.org/10.1172/JCI15337>.
73. Thiery, J. P., & Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(2), 131-142
74. Teicher, B. A., Marston, W., Linehan & Helman, L. J. (2012). Targeting Cancer Metabolism. *American Association for Cancer Research*. 18, 20, pp. 5537-5545.

75. Vázquez-Cuevas F. G., Cruz-Rico A., Garay E., García-Carrancá A., Pérez-Montiel D., Juárez B. & Arellano R. O. (2013) Differential expression of the P2X7 receptor in ovarian surface epithelium during the oestrous cycle in the mouse. *Reproduction, Fertility and Development* 25, 971-984.
76. Vázquez-Cuevas, F. G., Martínez-Ramírez, A. S., Robles-Martínez, L., Garay, E., García-Carrancá, A., Pérez-Montiel, D., Castañeda-García, C., & Arellano, R. O. (2014). Paracrine stimulation of P2X7 receptor by ATP activates a proliferative pathway in ovarian carcinoma cells. *Journal of cellular biochemistry*, 115(11), 1955–1966. <https://doi.org/10.1002/jcb.24867>
77. Von Kügelgen, I. (2006). Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol. Ther.* 110, 415–432.
78. Wan, H. X., Hu, J. H., Xie, R., Yang, S. M. & Dong, H., (2016). Important roles of P2Y receptors in the inflammation and cancer of digestive system. *Oncotarget* 7, 28736–28747.
79. Warburg, O. (1956), On the Origin of Cancer Cells. *American Association for the Advancement of Science*. 123, 3191, pp. 309-314 doi. 10.1126/science.123.3191.309
80. Wang, Q. E. (2015). DNA damage responses in cancer stem cells: Implications for cancer therapeutic strategies. *World journal of biological chemistry*, 6(3), 57.
81. Wang, X., Li, Y., Qian, Y., Cao, Y., Shriwas, P., Zhang, H., & Chen, X. (2017). Extracellular ATP, as an energy and phosphorylating molecule, induces different types of drug resistances in cancer cells through ATP internalization and intracellular ATP level increase. *Oncotarget*, 8(50), 87860–87877. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21231>
82. Wheaton, W. W., & Chandel, N. S. (2011). Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *American journal of physiology. Cell physiology*, 300(3), C385–C393. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00485.2010>
83. WHO: Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/101656343>.
84. Xie, R., Xu, J., Wen, G., Jin, H., Liu, X., Yang, Y., Ji, B., Jiang, Y., Song, P., Dong, H., et al. (2014). The P2Y2 nucleotide receptor mediates the proliferation and migration of human hepatocellular carcinoma cells induced by ATP. *J. Biol. Chem.* 289, 19137–19149.
85. Zhang, S., Mercado-Uribe, I., Xing, Z., Sun, B., Kuang, J., & Liu, J. (2014). Generation of cancer stem-like cells through the formation of polyploid giant cancer cells. *Oncogene*, 33(1), 116–128. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.96>
86. Zeisberg, M., & Neilson, E. G. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1429-1437.