



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**El papel de los receptores PTGER estimulados con
prostaglandina E₂ en la proliferación de líneas celulares de
cérvix**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

ULISES CORTES HERNANDEZ

CDMX, 2023





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: MARTINEZ BARAJAS J. ELEAZAR
VOCAL: Profesora: SANCHEZ NIETO SOBEIDA
SECRETARIO: Profesor: AVILA CHAVEZ EUCLIDES
1er. SUPLENTE: Profesora: MALDONADO JIMENEZ PERLA DEYANIRA
2º SUPLENTE: Profesora: BERNAL GRACIDA LILIA ANGELICA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DR.
CARLOS GUAL CASTRO, INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS
MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN, CDMX.**

ASESOR DEL TEMA:

DR. EUCLIDES AVILA CHÁVEZ

SUSTENTANTE:

ULISES CORTES HERNANDEZ

Reconocimientos

Este trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Biología de la Reproducción Dr. Carlos Gual Castro del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y fue apoyado con fondos del proyecto institucional BRE 2848 “El papel de los receptores activados de la prostaglandina E₂ en la expresión del oncogén Eag1 en células de cáncer cervical” bajo la dirección del Dr. Euclides Avila Chávez.

Se reconoce y se agradece a la Dra. Lorenza Díaz Nieto por el apoyo recibido y las asesorías brindadas durante la elaboración de este trabajo. Se agradece su apoyo para la obtención de un estímulo económico de ayudante de investigador por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Se reconoce y se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el estímulo económico otorgado durante el periodo de mayo de 2021 a mayo de 2022 (CVU 1115986) como ayudante de investigador de la Dra. Lorenza Díaz Nieto (CVU 21753).

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi alma mater, la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas y a todo lo que conlleva formar parte de su comunidad. En especial quiero agradecer a la Facultad de Química y a todos los docentes que contribuyeron a mi desarrollo personal y profesional.

A mis amigos por su apoyo durante mi proceso de tesis. Desde el inicio de este proyecto, ustedes han estado ahí para mí, brindándome su compañía, motivación y aliento. Por hacer más ameno todo el proceso desde que iniciamos la carrera.

También me gustaría expresar mi agradecimiento a mi director de tesis el Dr. Euclides Avila Chávez por su apoyo, dedicación y por la paciencia que ha tenido conmigo desde el inicio de este trabajo hasta su conclusión. Le agradezco por la confianza brindada a lo largo de este arduo camino y por todo el conocimiento que ha compartido conmigo, el cual me ha permitido crecer profesionalmente.

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por permitirme llevar a cabo este trabajo de investigación, por facilitarme todo lo que necesité para así poder concluirlo con éxito. Al Departamento de Biología de la Reproducción y a todos los investigadores que me apoyaron durante todo el proceso. Agradezco de manera especial a mis compañeros Bryan Javier Noriega Mejía, Jocelyn González Macías y Tomas Misael Lizardi Aguilera por su valiosa ayuda para la conclusión de este trabajo.

Por último, agradezco a mis sinodales: Al Dr. Eleazar Martínez Barajas, la Dra. Sobeida Sánchez Nieto, el Dr. Euclides Avila Chávez, por su tiempo, dedicación y compromiso en la revisión de mi tesis. Su presencia y sus comentarios fueron esenciales para que pudiera presentar mi trabajo de la mejor manera posible y estoy muy agradecido por ello.

Dedicatoria

Quiero dedicar este logro a mis padres Reyna Hernández Munguía y German Cortes Espinosa. No hay suficientes palabras para expresar mi agradecimiento por todo lo que han hecho por mí durante mi camino académico y en la vida en general.

Gracias por ser mis primeros maestros, por enseñarme los valores y principios que me han guiado en la vida y por ser mi fuente de inspiración y motivación.

Gracias por su amor incondicional, por su paciencia y por apoyarme en cada paso del camino, incluso cuando las cosas se ponían difíciles. Siempre me han dado lo mejor de ustedes, sin esperar nada a cambio.

Hoy, con esta tesis, quiero demostrarles que su sacrificio y esfuerzo no han sido en vano. Espero que se sientan orgullosos de lo que hemos logrado juntos y que esto sea una pequeña muestra de mi agradecimiento por todo lo que han hecho por mí.

Esta tesis está dedicada a los dos, con todo mi amor y gratitud. Gracias por ser los mejores padres que alguien pueda pedir.

A mis hermanos:Gerardo, Sandra y Leticia por su apoyo, por estar conmigo siempre que los he necesitado, por motivarme a ser día a día mejor persona, por ser mis ejemplos y mostrarme que las metas se cumplen con dedicación y disciplina.

Con amor,

Ulises Cortes Hernández

Abreviaturas:

15-PGDH	15-hidroxiprostaglandina deshidrogenasa
AA	Ácido araquidónico
AC	Adenilato ciclasa
AKT	Cinasa B de proteínas
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
CaSki PCMV3	Células CaSki transfectantes estables con plásmido vacío.
cDNA	DNA complementario
CI ₅₀	Concentración inhibitoria al 50%
COX	Ciclooxigenasa
cPGES	Prostaglandina sintasa citosólica
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc
DAG	Diacilglicerol
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatados
EAG1	Canal de potasio éter a-go-go 1
ELISA	Inmunoanálisis enzimático de adsorción
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
Gluc	Luciferasa de <i>Gaussia princeps</i>
IBMX	3-Isobutil-1-metilxantina
HSIL	Lesión intraepitelial escamosa de alto grado
IL	Interleucina
IP3	Trifosfato de inositol
KCNH1	Canal de potasio sensible al voltaje subfamilia H miembro 1
LSIL	Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado
mPGES	Prostaglandina sintasa microsomal

MRPs	Proteínas de resistencia a multidrogas
mTOR	Cinasa blanco de la rapamicina
PG	Prostaglandina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGG ₂	Prostaglandina G ₂
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PI3K	3-Fosfatidilinositol cinasa
PIP2	4,5-Bisfosfato de fosfatidilinositol
PKA	Cinasa A de proteínas
PKC	Cinasa C de proteínas
PLA	Fosfolipasa A
PLC	Fosfolipasa C
PTGER	Receptor de prostaglandina E ₂
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RIPA	Amortiguador del ensayo de radioinmunoprecipitación
RPL32	Proteína ribosomal L32
RPMI	Medio de cultivo del Instituto Roswell Park Memorial
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SEAP	Fosfatasa alcalina de secreción
SFB	Suero fetal bovino descomplementado
SNC	Sistema nervioso central
TBS	Solución salina amortiguada con Tris
VPH	Virus del papiloma humano
XTT	4-Metoxi-5-[3-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfonatofenil)-5-(fenilcarbamoil)tetrazol-3-iumo-2-ilo]-2-nitrobenzenosulfonato

ÍNDICE

Resumen	9
Introducción	10
El cáncer	10
El cáncer cervicouterino	12
La prostaglandina E ₂	16
Biosíntesis y degradación de la prostaglandina E ₂	17
Los receptores de la prostaglandina E ₂	20
La PGE ₂ y sus receptores en el cáncer	25
La PGE ₂ y sus receptores en el cáncer cervicouterino	28
Planteamiento del problema	29
Hipótesis	30
Objetivo general	30
Objetivos Específicos	30
Metodología	31
Cultivo celular	31
Derivación de células CaSki transfectantes estables para cada receptor PTGER	31
Estudios de proliferación	33
Estudios de expresión a nivel de RNA	34
Estudios de expresión a nivel de proteína	37
Cuantificación de AMP cíclico total	38
Actividad de transactivación de la región promotora del gen EAG1 por la PGE ₂ en las células CaSki	39
Análisis estadístico	40
Resultados	41
Discusión	56
Conclusiones	62
Referencias	63

Resumen

El factor de riesgo más importante para el desarrollo del cáncer cervicouterino es la infección persistente por los subtipos del virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH) como el VPH16, el virus más prevalente en el cáncer cervicouterino a nivel mundial. Otros factores de riesgo para este tumor incluyen a la prostaglandina E₂ (PGE₂), un lípido encontrado en elevadas concentraciones en el líquido seminal y en zonas de inflamación. La PGE₂, su sistema de síntesis y degradación, así como sus 4 receptores PTGER1-4, participan como promotores de diversos tipos de tumores. A la fecha no se conoce mucho acerca del papel de este sistema regulador en el cáncer cervicouterino por lo que nos propusimos investigar el efecto que tiene la PGE₂ sobre la proliferación de una línea celular con una alta carga viral de VPH16: las células CaSki. Contrario a lo esperado, la proliferación de las células CaSki fue inhibida significativamente por concentraciones subnanomolares de PGE₂. El efecto de la PGE₂ fue específico ya que el β -estradiol incrementó la proliferación celular. Para corroborar los resultados de proliferación, evaluamos la expresión génica de un canal oncogénico de potasio, el éter a-go-go-1 (EAG1), al que consideramos como un marcador molecular de proliferación. El transcrito del canal EAG1 así como la actividad de su promotor proximal fueron inhibidos significativamente por la PGE₂. Durante la caracterización de las células CaSki observamos que expresa diferencialmente los cuatro receptores PTGER1-4 y que produce AMP cíclico (AMPc) como segundo mensajero cuando las células se incuban con PGE₂. Para conocer más a detalle la participación de cada uno de los cuatro receptores PTGER en la proliferación de las células CaSki, obtuvimos un panel de células CaSki transfectantes estables para cada receptor y las correspondientes células controles. Estas células fueron seleccionadas con higromicina B y caracterizadas por la expresión de los receptores sobrexpresados y la producción de AMPc como segundo mensajero. En estas células transfectantes estables se notó mejor la inhibición de la proliferación celular por la PGE₂, siendo las células más sensibles las transfectadas con los receptores PTGER2 y PTGER4. En estas células también se observó la supresión significativa del transcrito del oncogen EAG1 por la PGE₂. Los resultados obtenidos nos sugieren que la PGE₂ inhibe la proliferación de células de cáncer cervicouterino positivas para VPH16, en parte a través de la supresión del canal EAG1 y abren la posibilidad de realizar más estudios encaminados a utilizar PGE₂ como tratamiento potencial en modelos de cáncer cervicouterino avanzado.

Introducción

El cáncer

El origen de la palabra cáncer se atribuye al médico griego Hipócrates (460-370 a. C.), a quien se considera el “Padre de la Medicina”. Hipócrates usó los términos *carcinos* y *carcinoma* para describir tumores que no forman úlceras y que forman úlceras. En griego, estas palabras se refieren a un cangrejo, lo más probable es que se apliquen a la enfermedad porque las proyecciones que se extienden como dedos de un cáncer recuerdan la forma de un cangrejo. El médico romano Celso (28-50 a. C.) más tarde tradujo el término griego por cáncer, la palabra latina para cangrejo. Galeno (130-200 d.C.), otro médico griego, usó la palabra *oncos* (palabra griega para hinchazón) para describir tumores. Aunque la analogía del cangrejo de Hipócrates y Celso todavía se usa para describir los tumores malignos, el término de Galeno ahora se usa como parte del nombre de los especialistas en cáncer: oncólogos.

Cáncer es el nombre que se le da a un conjunto de enfermedades relacionadas que tienen en común la proliferación excesiva y la diseminación a tejidos aledaños [1]. En condiciones normales o de homeostasis, las células de un organismo se encuentran en un balance entre las células producidas y las células que mueren mediante apoptosis, es por ello que el descontrol de la proliferación y por ende la pérdida de este balance conlleva a que se favorezca el desarrollo de un cáncer [1]. El cáncer es una de las causas principales de muerte en todo el mundo: casi 10 millones de fallecimientos en 2020 [2]. El cáncer se produce por la transformación de células normales en células tumorales las cuales tienen procesos proliferativos descontrolados. Este proceso de transformación consiste en varias etapas que va desde la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno [1]. Esto es resultado de factores genéticos y factores ambientales. Entre los factores genéticos, aquellos genes que pueden verse afectados en la aparición del cáncer pertenecen a tres categorías: los protooncogenes, genes supresores de tumores y genes de reparación de DNA, los cuales se encuentran más activos, menos activos y con alteraciones en su función, respectivamente. En general el cuerpo elimina aquellas células que sufren daños en el DNA antes de que estas se vuelvan cancerosas; sin embargo, esta capacidad disminuye a medida que envejecemos, por ello el riesgo de desarrollar algún tipo de cáncer aumenta con la edad.

Por otro lado, existen diversos factores ambientales que puede favorecer al desarrollo y progresión del cáncer. Algunos de ellos existen naturalmente en el ambiente, tales como algunas radiaciones, microorganismos, sustancias químicas naturales producidas por organismos vivos, minerales como el asbesto y la radiactividad natural [3]. Otros han sido producidos o incrementados directa o indirectamente por el impacto de las actividades humanas sobre el ambiente; como los subproductos de la combustión del petróleo, sustancias químicas artificiales, aditivos o pesticidas residuales en las comidas, algunas drogas y medicamentos, modificaciones atmosféricas, entre otros. En estos tipos lo factores ambientales pueden dividirse como:

Agentes infecciosos: virus o bacterias que provocan el cáncer. Los más comunes son virus tales como los subtipos de alto riesgo del virus del papiloma humano (VPH, relacionado con el cáncer de cuello de útero), los virus de la hepatitis B y C (relacionados con cáncer de hígado) o el virus Epstein Barr (asociado al linfoma de Burkitt). La única bacteria a la que se le ha encontrado hasta ahora una relación causal con el cáncer es *Helicobacter pylori*, que puede dar origen a cáncer gástrico en parte por causar úlceras gástricas.

Radiaciones: Todas las radiaciones ionizantes de intensidad suficiente son capaces de causar daños en el material genético, lo que a su vez puede desencadenar un cáncer con el tiempo. La mayoría de los casos de cáncer provocados por las radiaciones son causados por la exposición excesiva a los rayos ultravioleta tipo B del sol, causantes en su mayor parte de melanoma.

Minerales y compuestos químicos: Algunos minerales tales como el asbesto, han sido relacionados con el cáncer de pulmón. Otras sustancias químicas como las emisiones de la combustión del petróleo y sus derivados, los pesticidas arsenicales y no arsenicales, las pinturas, el hollín, los aceites minerales, etc. han sido asociados al cáncer de pulmón y de piel. Algunos fármacos con actividad estrogénica, incrementan el riesgo de desarrollar cáncer uterino (entre ellas ciertos anticonceptivos orales). Otros factores de riesgo de esta clase son el consumo de productos de tabaco y de bebidas alcohólicas en exceso, los cuales promueven el desarrollo de varios tipos de tumores.

El cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino o también conocido como cáncer de cuello uterino es la cuarta causa principal de muerte por cáncer entre las mujeres en todo el mundo como se muestra en la Figura 1. En 2020, se diagnosticó cáncer cervicouterino a 604 237 mujeres en todo el mundo, lo que representa el 6.5% de todos los cánceres femeninos. El cáncer cervicouterino es el cáncer más común entre las mujeres en 36 países de ingresos bajos y medianos, principalmente en África. El cáncer cervicouterino causó la muerte de 341 843 mujeres en 2020, de las cuales el 90% se encontraban en las regiones menos desarrolladas del mundo, donde el acceso a los servicios de prevención, detección y tratamiento es muy limitado [4]. Es de gran importancia mencionar que esta neoplasia es prevenible y curable en sus primeras etapas. También es importante mencionar que en países desarrollados la incidencia del cáncer cervicouterino se ha logrado reducir considerablemente debido a la implementación de programas de detección y tratamiento de lesiones tempranas [4].

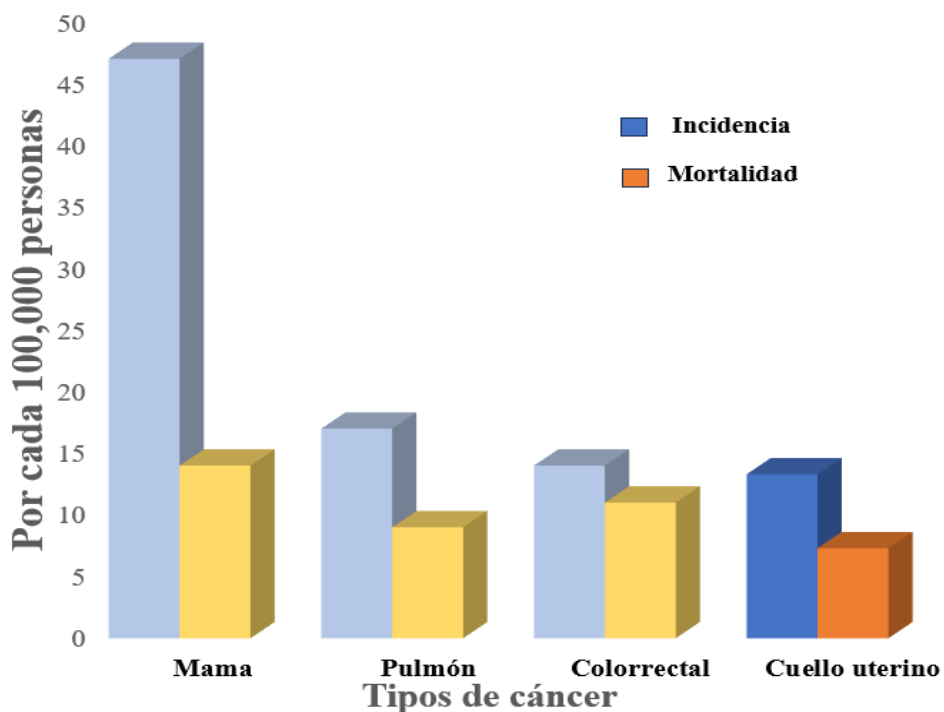


Figura 1. Tasas estimadas de incidencia y mortalidad de cáncer en mujeres. Principales cánceres que se presentan a nivel mundial en mujeres de 15-45 años de edad en el año 2020. Modificada del sitio gco.iarc.fr, Global Cancer Observatory, International Agency for Research on Cancer, Organización Mundial de la Salud, 2023.

Esta neoplasia se origina en las células que recubren al cuello uterino, es decir la parte inferior del útero. El cuello uterino es donde se conecta el útero (parte donde se desarrolla el feto) con la vagina. El cuello uterino se compone por dos partes y se componen de células diferentes, el primero es el endocérvix el cual es el conducto que lleva hasta el útero y este se encuentra recubierto por células glandulares (Figura 2). El exocérvix es la parte externa del cuello uterino y está recubierto por células escamosas (Figura 2).

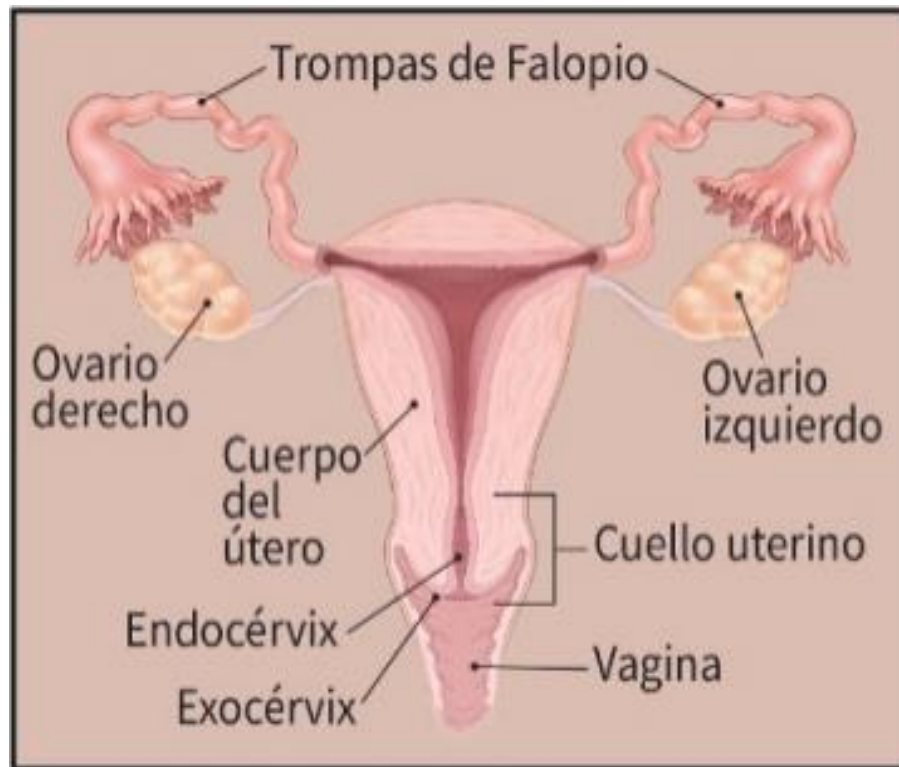


Figura 2. Composición anatómica del aparato reproductivo femenino. Modificada del sitio [cancer.org/cervical-cancer](https://www.cancer.org/cervical-cancer), American Cancer Society, 2023.

La aparición del cáncer no es repentina, para que este aparezca primero las células sanas del cuello uterino comienzan a generar cambios graduales a los cuales se les conoce como cambios precancerosos, estos tipos de cambios son denominados como lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LSIL). Cuando se presentan más alteraciones estructurales se considera que la lesión es más avanzada y se le denomina lesión escamosa intraepitelial escamosa de alto grado (HSIL). Estas lesiones resultan de las infecciones crónicas por subtipos de alto riesgo del VPH en células cervicales; dichos cambios normalmente se revierten gracias a la respuesta inmune y además a la velocidad con la cual las células del

cuello uterino se renuevan. Aproximadamente el 60% de las LSIL regresan a la normalidad después de un año, mientras que en el caso del HSIL tienen un alto riesgo de desarrollar un cáncer invasivo, aunque cabe destacar que el tiempo de progresión para que un cáncer se desarrolla es de varios años [5].

El principal factor de riesgo para la aparición del cáncer cervicouterino lo constituyen las reinfecciones constantes por subtipos de alto riesgo del VPH, de los cuales 13 de ellos son los más prevalentes en tumores cervicales (VPH16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) [5]. De estos subtipos de VPH de alto riesgo aquellos de mayor importancia son el VPH 16 y el VPH 18, debido a que el VPH16 es el causante de más del 50% de los casos de cáncer de cuello uterino en el mundo, mientras que el VPH18 equivale al 16.5% haciéndolo así el segundo tipo más cancerígeno [5]. Las infecciones con subtipos de VPH de bajo riesgo generalmente producen lesiones benignas y existe una mínima probabilidad de que puedan progresar a una displasia o al cáncer.

Otro factor de riesgo reportado es el uso de anticonceptivos orales por tiempos prolongados, este factor de riesgo también resulta importante ya que es de los métodos anticonceptivos de mayor apego que existe a nivel mundial [6]. Más de 100 millones de mujeres utilizan actualmente anticonceptivos orales. La influencia hormonal es lo que genera que este tipo de anticonceptivos sean considerados un factor de riesgo y se debe a que esta influencia evita la ovulación, lo cual genera una disminución en la progesterona haciendo que el endometrio no se desprenda. Esto produce que las células del endometrio como respuesta a los estrógenos pueden generar una hiperplasia, es decir se produce un aumento en la cantidad de células del tejido y puede ocurrir que estas células se vuelvan malignas y por ende se pueda producir un cáncer cervical. Es por ello que las revisiones de rutina son de gran importancia para la detección ya sea de cáncer cervicouterino o de lesiones LSIL en las cuales son tratables e inclusive curables. Estas pruebas constan de la detección oportuna de subtipos de alto riesgo del VPH y las pruebas citológicas del cérvix. Se recomienda que las mujeres se realicen un Papanicolaou con cierta regularidad desde los 21 años de edad. Entre los 21-29 años se recomienda un Papanicolaou cada tres años; posteriormente, entre los 30-65 años se debe realizar un Papanicolaou y una prueba del VPH cada 5 años [7].

Dependiendo de la etapa y localización del cáncer cervicouterino, se pueden optar por distintos tratamientos. La cirugía generalmente se usa en cánceres de cuello uterino en etapa temprana. El objetivo de estas es extirpar la mayor cantidad de enfermedad posible. Sin embargo, por lo general no se usa a menos que se pueda extirpar todo el cáncer en el momento de la cirugía. Aquellos cánceres que tienen una alta probabilidad de propagarse a los ganglios linfáticos no se tratan con cirugía. Hay algunos tipos diferentes de cirugías que se pueden realizar. El tipo de esta dependerá del estadio del tumor. Los procedimientos quirúrgicos para el cáncer de cuello uterino incluyen la traquelectomía, en la cual se extirpa el cuello uterino, el tejido que rodea el cuello uterino y en caso de ser necesario también se pueden extirpar los ganglios linfáticos pélvicos. El otro tipo de cirugía es la histerectomía en la cual se extirpa tanto al útero como al cuello uterino.

Adicionalmente a la cirugía, la radioterapia es muy eficaz en el tratamiento del cáncer cervicouterino en etapa temprana e inclusive es efectiva en etapas avanzadas. Para esta se utilizan rayos X de alta energía para destruir las células cancerosas. La radiación también ayuda a evitar la cirugía en pacientes que están demasiado débiles para evitar arriesgarse a recibir anestesia. La radiación tiene la ventaja de poder tratar toda la enfermedad en el campo de radiación, de manera que los ganglios linfáticos pueden tratarse, así como el tumor primario en el mismo tratamiento. A pesar de que los tumores se extirpan mediante cirugía o se tratan con radiación, siempre existe el riesgo de recurrencia porque pueden quedar células cancerosas microscópicas en el cuerpo. Para disminuir el riesgo de recurrencia se puede administrar quimioterapia.

De igual forma existe la terapia dirigida la cual es un tipo de tratamiento en la que se usan medicamentos u otras sustancias para identificar y atacar células cancerosas específicas sin dañar las células normales. La terapia con anticuerpos monoclonales es un tipo de terapia dirigida. Estos anticuerpos pueden identificar sustancias en las células cancerosas o sustancias normales que pueden ayudar al crecimiento de las células cancerosas.

Otro tipo de terapia es la inmunoterapia, la cual es un tratamiento que utiliza el sistema inmunitario del paciente para combatir el cáncer. En este tipo de terapia se ocupan las sustancias elaboradas por el cuerpo o sintetizadas en un laboratorio para estimular, dirigir o restaurar las defensas naturales del cuerpo contra el cáncer [8].

La prostaglandina E₂

La prostaglandina E₂ (PGE₂) es un lípido bioactivo que tiene una gran variedad de efectos biológicos asociados con el proceso de inflamación. La PGE₂ es un prostanoide de la subclase de los eicosanoides, los cuales son producidos por oxidación de ácidos grasos esenciales de 20 átomos de carbono que comúnmente se incorporan dentro de la membrana lipídica [9]. La PGE₂ lleva a cabo sus funciones mediante la unión a los receptores PTGER (del inglés “ProsTaGlandin E₂ Receptor”, también denominados “receptores EP”), los cuales constan de cuatro subtipos (PTGER 1-4) [10]. La PGE₂ desempeña un papel fundamental en la respuesta inflamatoria, sin embargo, también tiene efectos inmunosupresores muy importantes, por los cuales también participa en la fase de resolución de la inflamación, facilitando así la regeneración de tejidos y favoreciendo el retorno a la homeostasis (Figura 3). Resulta muy importante mencionar que estas propiedades multifacéticas de la PGE₂ dependen tanto del tipo celular como del contexto en donde se encuentre.

La PGE₂ participa en la fase inicial de la respuesta inflamatoria ocasionada por una infección o lesión, esta actúa como un vasodilatador, lo cual facilita que se recluten en el lugar de la lesión células del sistema inmune como los macrófagos, neutrófilos y los mastocitos, generando así el inicio de la inflamación [11]. Además, la PGE₂ estimula los nervios sensoriales para aumentar la respuesta al dolor y actúa sobre las neuronas en el área preóptica (área que modula la temperatura) para promover los efectos pirogénicos. Otro efecto que esta produce y que aumenta el efecto inflamatorio es su capacidad de promover la activación de células TH₁₇, las cuales son un subconjunto de células T cooperadoras CD4+ y que se caracterizan por su producción de la interleucina (IL)-17 [12].

De manera interesante, la PGE₂ también puede tener un efecto anti-inflamatorio, principalmente en células del sistema inmunológico. En general este proceso es debido a un cambio de respuesta TH₁ (proinflamatoria) hacia una respuesta tipo TH₂ (anti-inflamatoria) en la cual la PGE₂ inhibe la señalización de la IL-2 y su receptor [12].

Como parte del mecanismo de reparación de tejidos, la PGE₂ induce directamente la proliferación de células epiteliales a través de la activación de varias vías de señalización clave, incluidas PI3K/Akt (Fosfoinositol 3 cinasa/ Proteína Cinasa B). También la

PGE₂ puede estimular la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular en los fibroblastos de pulmón y estómago, promoviendo así la angiogénesis [12].

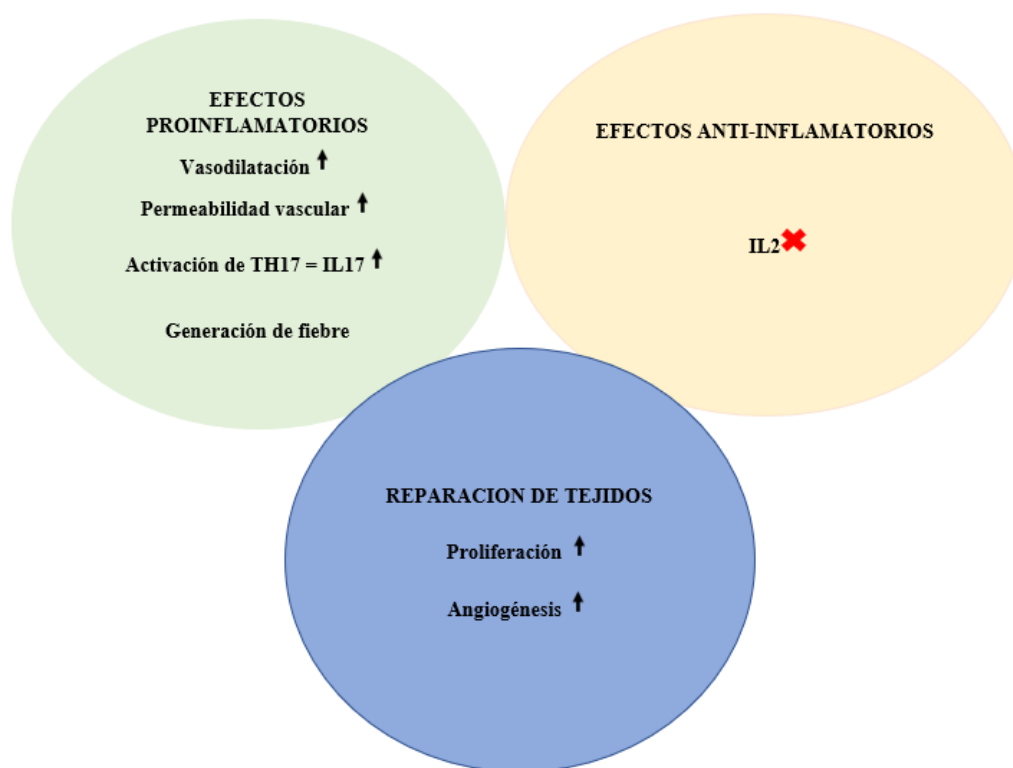


Figura 3. Efectos de la PGE₂ en la reparación de heridas. Durante la inflamación, la PGE₂ favorece la vasodilatación, aumenta la permeabilidad vascular para diferentes moléculas o incluso células del sistema inmunológico. También puede participar en el proceso de fiebre y en la activación de linfocitos TH₁₇, los cuales producen la interleucina 17 (IL17), ésta última puede activar células epiteliales y endoteliales para producir citocinas pro-inflamatorias favoreciendo así el proceso de inflamación. Por otro lado, la PGE₂ también tiene efectos anti-inflamatorios ya que inhibe la síntesis y la señalización de la interleucina 2 (IL2). Finalmente, la PGE₂ participa en el proceso de reparación de tejidos mediante la activación de la vía PI3k-Akt incrementando la proliferación y la angiogénesis.

Biosíntesis y degradación de la prostaglandina E₂

La síntesis de la PGE₂ se inicia por el efecto de las fosfolipasas (PLA), una familia de enzimas que catalizan la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana, generando así la liberación de ácidos grasos libres, incluido el ácido araquidónico (AA) [9].

El AA liberado por la membrana se oxida rápidamente en el metabolito relativamente inestable al cual se le conoce como prostaglandina G₂ (PGG₂), este metabolito posteriormente se reduce a la prostaglandina H₂ (PGH₂), ambos pasos catalizados secuencialmente por las enzimas ciclooxigenasas (COX). Existen dos isoformas principales de COX; la COX1 la cual es constitutivamente activa y está presente en la mayoría de las células del cuerpo, mientras que la expresión constitutiva de la COX2 está restringida en gran medida al riñón, así como en áreas del sistema nervioso central. Sin embargo, los niveles de COX2 son altamente inducibles en muchos tejidos por estímulos proinflamatorios y mitógenos, incluidas las citocinas y los factores de crecimiento. Una vez que ya se sintetizó la PGH₂, actúa alguna de las isoenzimas de la sintasa de PGE₂, las cuales son 3: la microsomal-1 (mPGES-1), la microsomal-2 (mPGES-2) y la citosólica (cPGES). La mPGES-1 es frecuentemente inducida simultáneamente con COX2 por varios estímulos proinflamatorios para generar un alza en los niveles de PGE₂. Mientras tanto para el caso de la mPGES-2 y cPGES se expresan constitutivamente y se acoplan con la COX1 para mantener los niveles basales de PGE₂. Una vez sintetizadas, las prostaglandinas son transportadas fuera de la célula por las proteínas asociadas a la resistencia a multidrogas (MRPs) de entre las cuales la MRP4, actúa como el transportador primario de prostaglandinas. Una vez exportadas, las prostaglandinas se unen a sus receptores acoplados a proteínas G [13] (Figura 4).

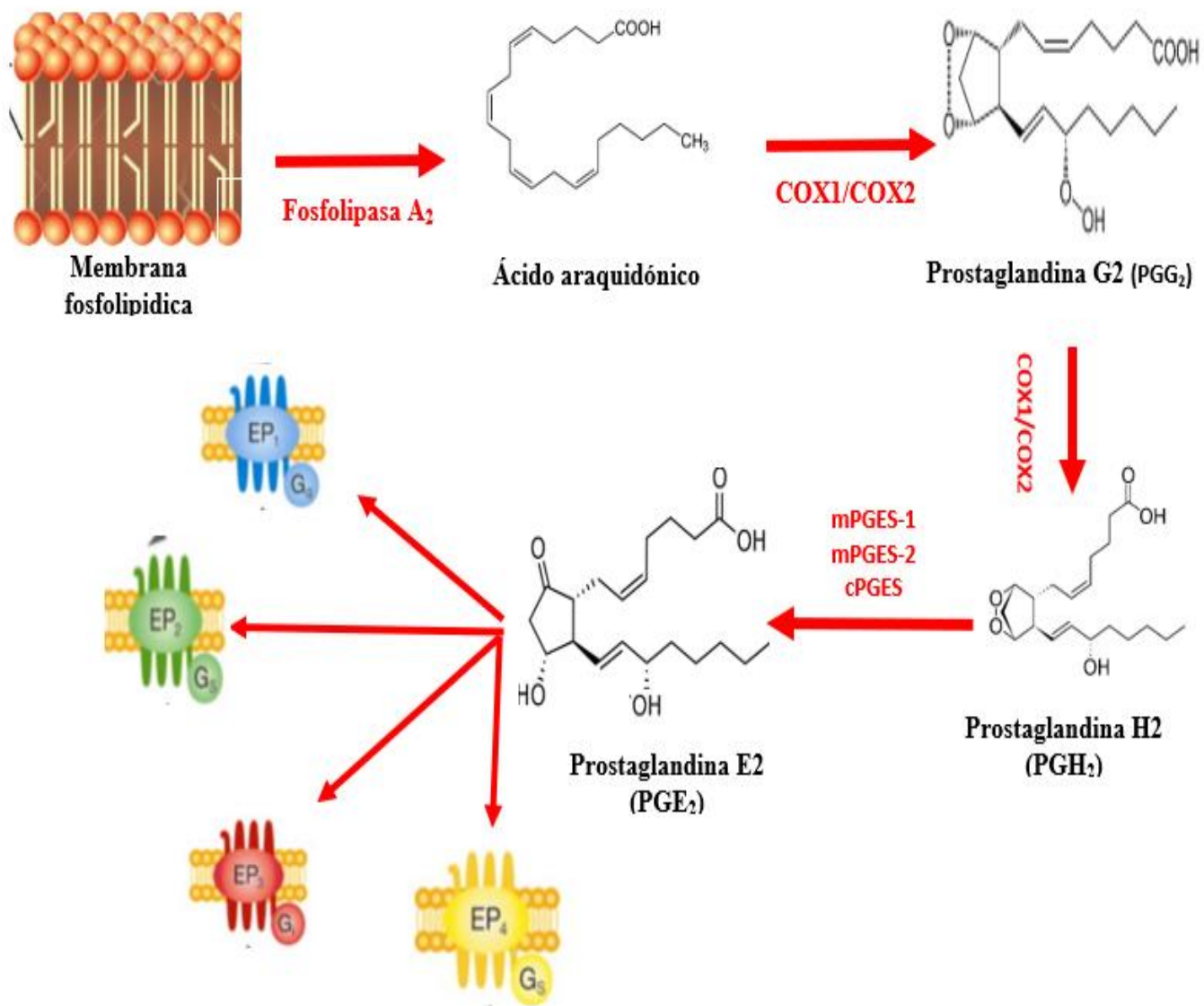


Figura 4. Biosíntesis de la prostaglandina E₂. En rojo se muestran las enzimas que intervienen en su síntesis y al final se muestran cuáles son los receptores que son activados por este agonista. Modificada de [12].

La inactivación de la PGE₂ es llevada principalmente por la 15-hidroxi prostaglandina deshidrogenasa (15-PGDH), una proteína NAD⁺-dependiente de la familia de la alcohol deshidrogenasa que cataliza la oxidación del grupo 15(S)-hidroxilo de las prostaglandinas, lo que da como resultado la formación de metabolitos 15-ceto que exhiben actividades biológicas muy reducidas (Figura 5) [14].

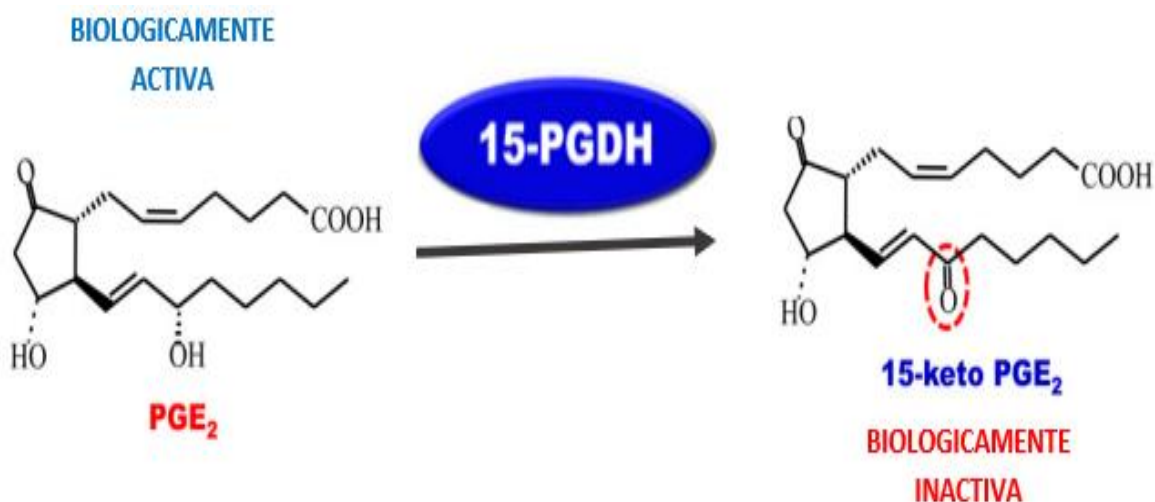


Figura 5. Inactivación de la PGE₂. La enzima 15-hidroxi prostaglandina deshidrogenasa (15-PGDH) promueve la oxidación del grupo 15-hidroxilo presente en la PGE₂, transformando la PGE₂ que es biológicamente activa a 15-ceto PGE₂ la cual no tiene actividad biológica. Modificada de [14].

Los receptores de la prostaglandina E₂

Como ya se había mencionado existen 4 subtipos de receptores mediante los cuales la PGE₂ puede tener efecto, estos subtipos se expresan de forma tejido-específica en el cuerpo humano. El receptor PTGER1 se localiza en el miometrio (capa muscular externa del útero), en las venas pulmonares, el colon, la piel y los mastocitos; PTGER2 se encuentra en los leucocitos, el músculo liso, en el sistema nervioso central (SNC), en los huesos y en el sistema reproductivo; PTGER3 abunda en el sistema cardiovascular, el riñón, la vejiga y al igual que PTGER2 también se encuentra en el SNC y el sistema reproductivo. El receptor PTGER4 se localiza en leucocitos, el músculo liso, el sistema cardiovascular y en los huesos [15].

Entre los receptores PTGERs, PTGER3 y PTGER4 son los que se encuentran más ampliamente expresados, mientras el receptor PTGER1 tiene una expresión muy restringida en los seres humanos. Todos los subtipos de PTGERs se localizan en la membrana plasmática y para el caso de PTGER3 y PTGER4 también se han detectado en la membrana nuclear [15].

A semejanza de los receptores para otros prostanoides, los PTGERs son receptores acoplados a proteínas G. Los receptores PTGERs pertenecen a la superfamilia de receptores con 7 segmentos transmembranales en los que cada subtipo de receptor se encuentra acoplado funcionalmente a un tipo de proteína G heterotrimérica particular. La unión de la PGE₂ a cada uno de los subtipos de PTGER activa vías de señalización intracelular específicas.

El receptor PTGER1 está acoplado a una proteína G α q. Al unirse la PGE₂ al PTGER1, se activa primero la fosfolipasa C β (PLC β), la cual favorece por una parte la hidrólisis de fosfoinosítidos que incrementan la concentración de calcio intracelular y por otra parte la generación de diacilglicerol (DAG). La presencia de DAG en un medio con alto contenido de calcio activa a las isoformas clásicas de la cinasa C de proteínas (PKC), la cual puede fosforilar y activar varios sustratos intracelulares teniendo diferentes efectos [10] (Figura 6).

Por otra parte, el receptor PTGER3 está acoplado a una proteína G α i. La activación de PTGER3 por la PGE₂ ocasiona que la proteína G α i pueda interactuar con la adenilato ciclasa (AC) y bloquee su actividad; es decir, que evita que transforme el trifosfato de adenosina (ATP) en monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). Las bajas concentraciones de AMPc impiden la activación de la cinasa A de proteínas (PKA) y con ello se evita la fosforilación de sustratos de esta cinasa (Figura 7).

Los receptores PTGER2 y PTGER4 se encuentran acoplados a una proteína G α s. Por ello, la activación de PTGER2 y PTGER4 por la PGE₂ activa a la adenilato ciclasa, lo cual se traduce en el incremento en la síntesis de AMPc y por ende la activación de la cinasa A de proteínas para que esta pueda fosforilar a sus sustratos (Figura 8).

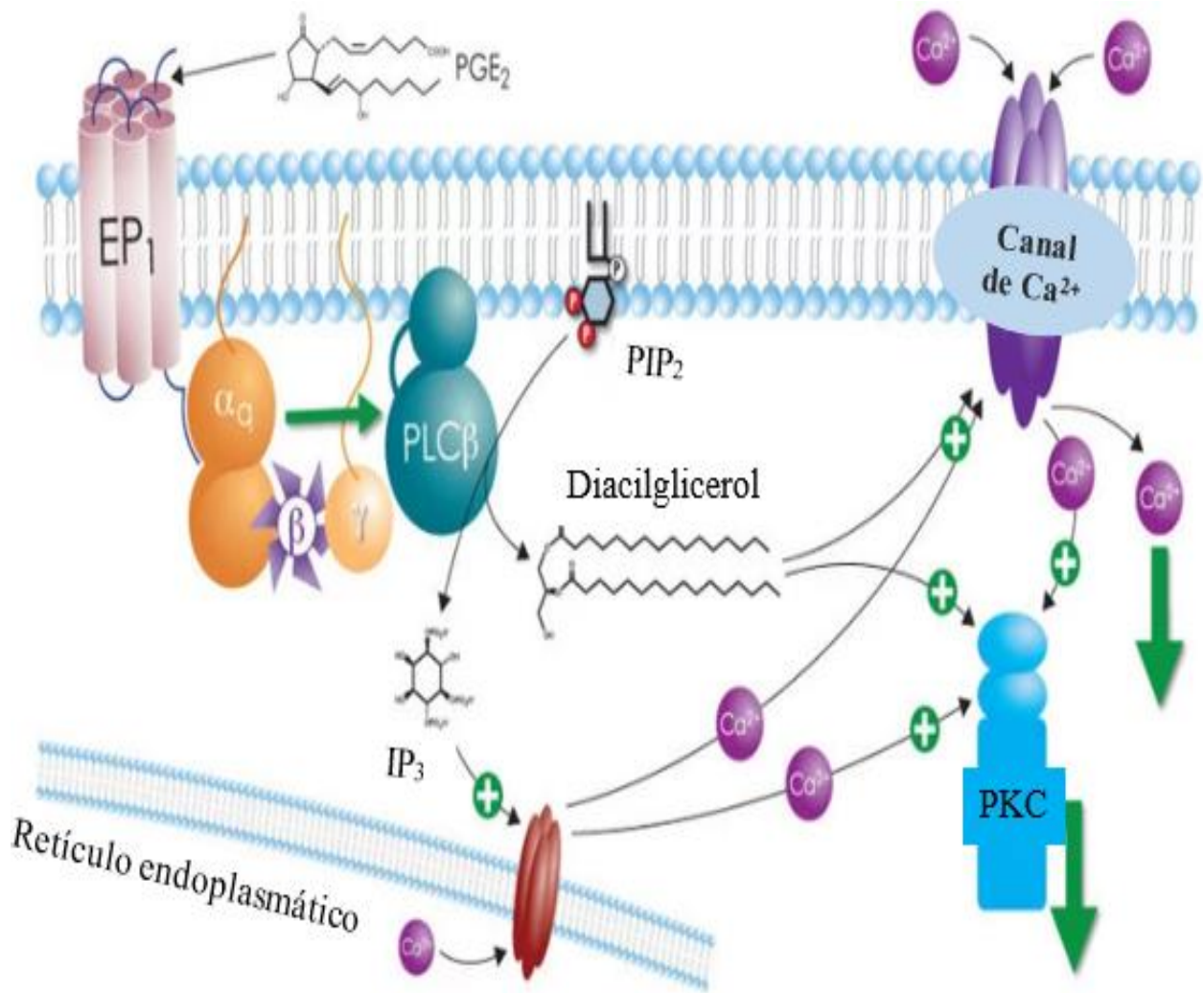


Figura 6. Activación del receptor PTGER1 por la PGE₂. El receptor PTGER1 activado por la PGE₂ activa a una proteína Gαq y posteriormente a la fosfolipasa β (PLCβ). Esta enzima hidroliza al bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP₂) en 1,4,5-trisfosfato de fosfatidilinositol (IP₃), el cual moviliza el calcio de reservorios intracelulares. La PLCβ además produce diacilglicerol que activa a la cinasa C de proteínas (PKC) en presencia de Ca²⁺. Una vez activa, la PKC activa numerosas vías de transducción de señales intracelulares. Modificado de [16].

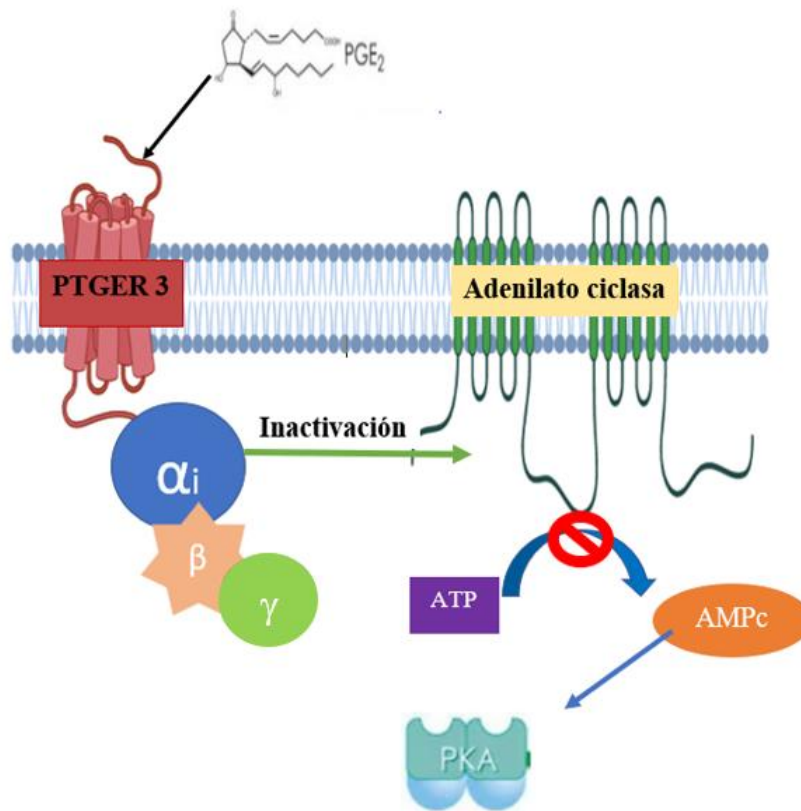


Figura 7. Activación del receptor PTGER3 por la PGE₂. La activación de PTGER3 por a la PGE₂ esta acoplada a una proteína G α_i , por lo cual se inactiva la función de la adenilato ciclasa disminuyendo la concentración de AMPc; por lo tanto, no hay activación de la cinasa A de proteínas (PKA). Modificado de [16].

Los cuatro receptores PTGER tienen múltiples efectos en la fisiología y ocasionalmente en una misma célula coexisten dos o más receptores PTGER, haciendo difícil determinar la contribución funcional de cada uno de ellos. Sin embargo, utilizando modelos homocigotos nulos de estos receptores, experimentos de ganancia de función y con el uso de inhibidores selectivos, ha sido posible determinar funciones particulares de cada uno de los receptores PTGER [9]. De manera general, PTGER1 participa en la contracción muscular y en la regulación de la presión sanguínea y en el SNC, aumenta la sensibilidad al dolor, participa en el control de la temperatura, la inhibición del sueño y también juega un papel en los cambios de comportamiento relacionados con la dopamina [17].

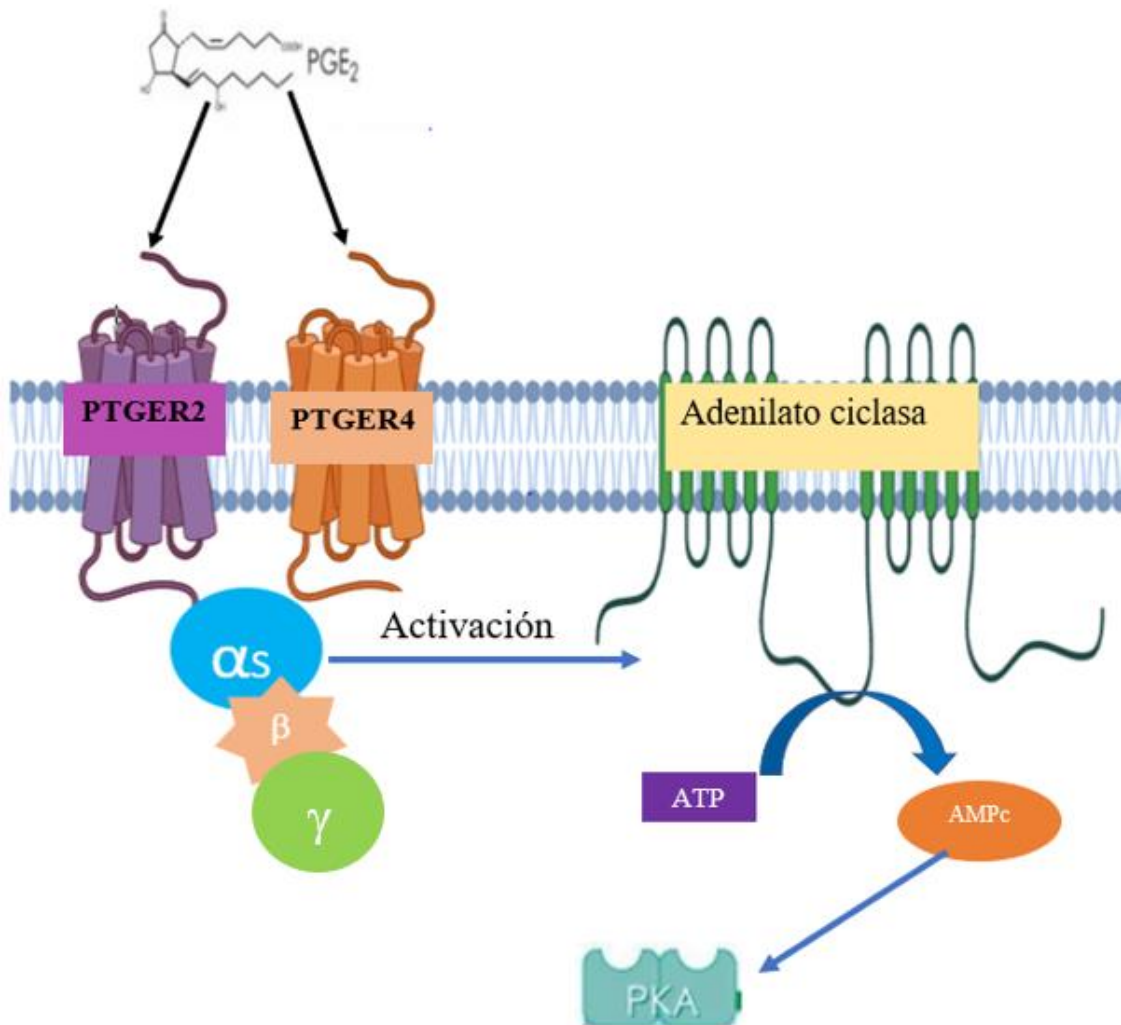


Figura 8. Activación de los receptores PTGER2 y PTGER4 por la PGE₂. Ambos receptores se encuentran acoplados a una proteína G α s, la cual induce la activación de la adenilato ciclasa, aumentando así la concentración de AMPc que al actuar como segundo mensajero activa a la cinasa A de proteínas (PKA). Modificado de [16].

El receptor PTGER2 es el menos abundante de los receptores PTGER y se encuentra asociado con numerosos procesos fisiológicos y también en la fisiopatología de varias enfermedades. Por ejemplo, PTGER2 participa como modulador del sistema inmunológico, principalmente actuando como un supresor de las células T asesinas naturales y de los macrófagos y promoviendo el desarrollo de las células T reguladoras, las cuales funcionan como inhibidores del sistema inmunológico. Adicionalmente, el receptor PTGER2 activado tiene un papel hipotensor en el ojo, mantiene la fertilidad femenina debido a diversos efectos

en el ovario, induce la hipotensión del sistema cardiovascular, tiene efectos neuroprotectores y participa en la homeostasis del hueso [18]. PTGER3 es un receptor único entre los PTGER ya que este tiene múltiples isoformas; sin embargo, la isoforma que está ligada a la vía de señalización de una proteína $G\alpha i$ es la que mayormente se encuentra reportada. Las otras isoformas de PTGER3 están ligadas a otras vías de señalización y es por ello que pueden existir controversias entre los efectos dependiendo del tipo celular [19]. Entre los efectos debidos al receptor activado PTGER3 se encuentra la protección de la mucosa duodenal del contenido ácido del estómago, la generación de la fiebre, el control de la presión arterial, el incremento en la permeabilidad vascular, la inhibición de las reacciones alérgicas y como promotor de la agregación plaquetaria [20]. Para el caso del receptor PTGER4, su señalización está estrechamente relacionada con la hipertrofia cardiaca, la vasodilatación, la remodelación vascular y ósea, la homeostasis gastrointestinal y también presenta funciones reproductivas y renales [21].

La PGE₂ y sus receptores en el cáncer

Debido a que la PGE₂ es un agente proinflamatorio y a que la inflamación crónica es una marca temprana de carcinogénesis [22], la síntesis y degradación de la PGE₂, así como la activación de los receptores PTGER, tienen participación en diversas neoplasias humanas [13, 23, 24]. Un ejemplo de ello es la inhibición de las enzimas COX con antiinflamatorios no esteroideos que disminuyen la aparición de tumores [25].

En referencia a los receptores PTGER, PTGER1 se ha encontrado en varios tipos de células tumorales, incluidas las células de cáncer de mama, del cáncer de colon y en células de cáncer hepatocelular. En estos últimos tumores, se ha encontrado una relación directa entre la expresión de PTGER1 y la progresión del cáncer [26, 27]. Sin embargo, en otro estudio usando un modelo murino de cáncer de mama metastásico se encontró que al utilizar un antagonista del receptor PTGER1 se promovía la metástasis; es decir, que PTGER1 tiene un papel protector contra la diseminación del cáncer de mama [28]. Estas observaciones nos permiten inferir que el efecto de la PGE₂ a través del receptor PTGER1 es tejido dependiente (Figura 9).

El papel del receptor PTGER3 en la tumorigénesis no está del todo claro, ya que en diferentes estudios se han obtenido diferentes efectos que parecen contradictorios entre sí. Por ejemplo, se ha encontrado que la supresión genética del PTGER3 no tiene un efecto sobre la formación de tumores de colon en modelos de ratones [29]. Sin embargo, en otro estudio el antagonismo del receptor PTGER3 en cáncer de próstata aumentó el crecimiento tumoral *in vitro*, lo cual indicaría que la señalización de PTGER3 tiene un efecto protector a diferencia del efecto encontrado en el modelo de cáncer de colon en ratón [30]. Estas diferencias en los resultados obtenidos en dichos estudios se pueden deber a que PTGER3 tiene diferentes isoformas que pueden estimular la formación de AMPc o inhibirla desencadenando diferentes respuestas, además también se puede deber a la localización del receptor así como el microambiente, lo cual indica que los efectos son dependientes del tejido [23] (Figura 9).

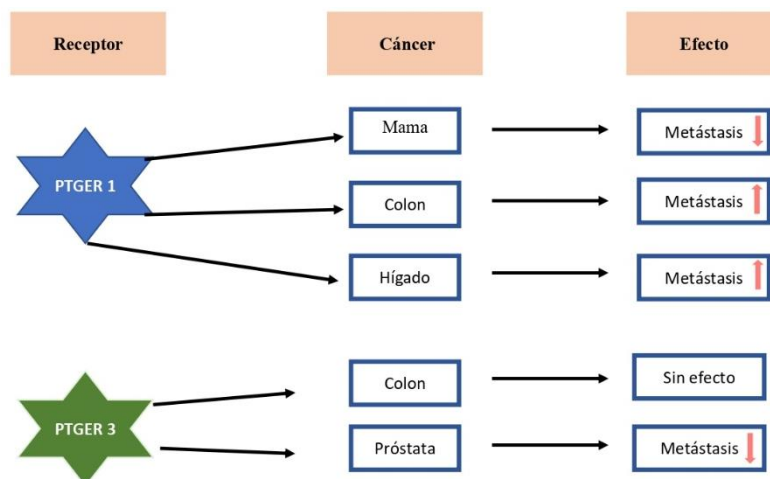


Figura 9. Efectos de los receptores PTGER1 y PTGER3 en el cáncer. En general, estos receptores protegen del progreso del cáncer en los seres humanos, excepto en el caso del cáncer hepático y de colon donde se ha observado que el receptor PTGER1 promueve la metástasis.

Algunos estudios han demostrado que PTGER2 se expresa de manera anormal en el cáncer, incluido el cáncer de colon, próstata, hígado y mama. En estos tumores, PTGER2 favorece el desarrollo del cáncer ya que induce inflamación crónica, participa en la evasión inmunológica de los tumores, favorece la angiogénesis, facilita la invasión celular y la metástasis, y promueve la resistencia a los fármacos por parte de las células tumorales [18] (Figura 10).

Por otro lado, el receptor PTGER4 frecuentemente se encuentra altamente expresado en tumores de mama, próstata, colon, ovario y pulmón. La señalización de dicho receptor en los tumores se relaciona con el incremento de la proliferación, la migración, la invasión, la angiogénesis y la evasión del sistema inmune [31] (Figura 10).

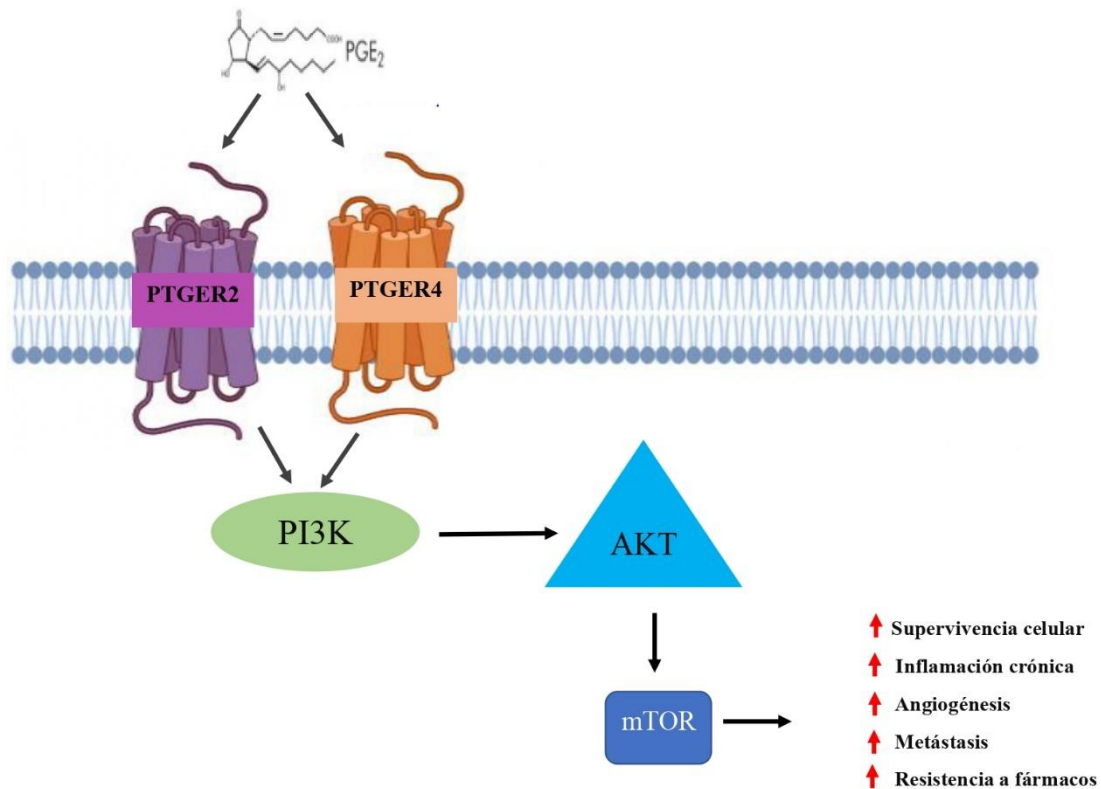


Figura 10. Efectos protumorales de los receptores PTGER2 y PTGER4 activados por la PGE₂. La activación de la vía PI3K-AKT-mTOR por la unión de la PGE₂ a PTGER2 y PTGER4 favorece el desarrollo del cáncer ya que promueve la supervivencia celular, la angiogénesis, la metástasis, la resistencia a fármacos y la inflamación crónica. Modificado de [16].

La PGE₂ y sus receptores en el cáncer cervicouterino

Hasta la fecha no se ha encontrado que PTGER1 tenga alguna participación en la fisiopatogenia del cáncer cervicouterino. Se sabe poco sobre la expresión del receptor PTGER3 o la señalización de la PGE₂ vía PTGER3 en el cáncer cervicouterino; sin embargo, un estudio encontró que a mayor expresión de PTGER3 menor es la supervivencia [32], a través de diversos mecanismos entre los cuales se encuentra el incremento de la migración de las células tumorales [33].

Por otra parte, la síntesis de PGE₂, así como la expresión de PTGER2 y PTGER4 se encuentran incrementados en tumores cervicales en comparación con sus contrapartes normales [34-39]. En particular, para el receptor PTGER2, los resultados obtenidos en 38 pacientes que padecían algún tipo de lesiones precancerosas, mostraron que la expresión de PTGER2 se incrementaba conforme progresaba la severidad de las lesiones, por lo que se concluyó que la expresión de dicho receptor indica un mal pronóstico [38]. El receptor PTGER4 incrementa su expresión por el oncogen E5 del VPH16 [39]. De manera interesante, la PGE₂ vía PTGER4 tiene efectos en la biosíntesis de estrógenos mediados por la aromatasa en las células endometriales. La acción combinada de la inflamación crónica dada por el receptor PTGER4 activado por la PGE₂ y los estrógenos producidos localmente son señales que pueden promover la progresión del cáncer cervicouterino [40-42].

Planteamiento del problema

El cáncer cervicouterino es una de las neoplasias de mayor persistencia sobre todo en países en vías de desarrollo. El principal factor de riesgo para desarrollar esta neoplasia es la infección persistente por VPHs de alto riesgo; sin embargo, existen otros factores de riesgo como puede ser la PGE₂, la cual se encuentra en elevadas concentraciones en el semen humano. La PGE₂ es un factor proinflamatorio e inmunosupresor de gran importancia que actúa a través de 4 receptores PTGER. Estos receptores se encuentran estrechamente relacionados con la progresión y desarrollo de diferentes tipos de cáncer, ya que su activación puede llevar a procesos como la inflamación crónica, proliferación excesiva, angiogénesis incrementada, resistencia a fármacos y promoción de la metástasis. Sin embargo, no se conoce el efecto de la PGE₂ y sus receptores PTGER en la proliferación de células de cáncer cervicouterino que posean secuencias del genoma de VPHs de alto riesgo. Esto corresponde a la meta científica del presente trabajo, en el cual se utilizó como modelo biológico a la línea celular establecida de cáncer cervical CaSki, la cual contiene alrededor de 600 copias del genoma del VPH16 [43], el subtipo de virus más prevalente en el cáncer cervicouterino [5]. Considerando que 3 de los cuatro receptores PTGER (PTGER2, PTGER3 y PTGER4) tienen propiedades oncogénicas en el contexto del cáncer cervicouterino, se espera que las células CaSki tratadas con PGE₂ incrementen su tasa de proliferación y de manera colateral incrementen la expresión de algún marcador de proliferación. En este trabajo elegimos como marcador de proliferación a la expresión del canal de potasio éter a-go-go-1 (EAG1 o KCNH1), un canal iónico oncogénico cuya expresión correlaciona con la proliferación de una gran variedad de neoplasias incluyendo al cáncer cervicouterino [44, 45]. Los resultados del presente trabajo contribuyen al entendimiento del papel que tienen los receptores PTGER activados por la PGE₂ sobre la proliferación de células de cáncer cervicouterino.

Hipótesis

Tomando en cuenta lo reportado en la literatura sobre los efectos prooncogénicos que tiene la PGE₂ al activar sus receptores (PTGER1-4), se espera que las células CaSki incrementen significativamente su proliferación al ser incubadas en la presencia de PGE₂.

Objetivo general

Evaluar la participación que tiene cada receptor PTGER activado con PGE₂ en la proliferación de las células CaSki de cáncer cervical.

Objetivos Específicos

Evaluar el efecto de la PGE₂ sobre la proliferación celular y sobre marcadores de proliferación en células CaSki.

Generar células CaSki transfectantes estables para cada uno de los receptores PTGER.

Caracterizar funcionalmente las diferentes sublíneas de células CaSki transfectantes estables para cada uno de los receptores PTGER.

Estudiar el efecto de la PGE₂ sobre la proliferación celular de las diferentes sublíneas CaSki transfectantes estables para cada uno de los receptores PTGER.

Evaluar el efecto de la PGE₂ sobre expresión del canal de potasio EAG1 en las diferentes sublíneas CaSki transfectantes estables para cada uno de los receptores PTGER.

Metodología

Cultivo celular

Las células CaSki [43] utilizadas en este trabajo fueron adquiridas de un proveedor comercial (ATCC, E.E.U.U.). Las células CaSki se cultivaron en medio de siembra [RPMI suplementado con suero fetal bovino descomplementado (SFB) 5% y penicilina/estreptomicina 1% (Gibco, E.E.U.U.)] en condiciones estándares de cultivo celular (37°C, CO₂ 5%, humedad relativa de 85%).

Derivación de células CaSki transfectantes estables para cada receptor PTGER

En este trabajo también se derivaron varias sublíneas de células CaSki a partir de las células descritas anteriormente, las cuales fueron transfectadas con vectores de expresión para cada uno de los cuatro receptores PTGER, así como una clona de células CaSki control que contiene solamente el plásmido utilizado para la transfección pero que no contiene ningún transgen (Tabla 1 y Figura 11).

Tabla 1. Células CaSki transfectantes estables generadas en este trabajo y vectores utilizados.

Nombre de sublínea transfectante estable	Plásmido	Proteína sobrepresada	Número de acceso del cDNA clonado y tamaño
CaSki PCMV3	pCMV3-untagged-NCV	ninguna	
CaSki PTGER1	pCMV3 PTGER1	PTGER1	NM_000955.2 (1209 pb)
CaSki PTGER2	pCMV3 PTGER2	PTGER2	NM_000956.3 (1077 pb)
CaSki PTGER3	pCMV3 PTGER3	PTGER3	NM_198716.1 (1125 pb)
CaSki PTGER4	pCMV3 PTGER4	PTGER4	AY429109 (1467 pb)

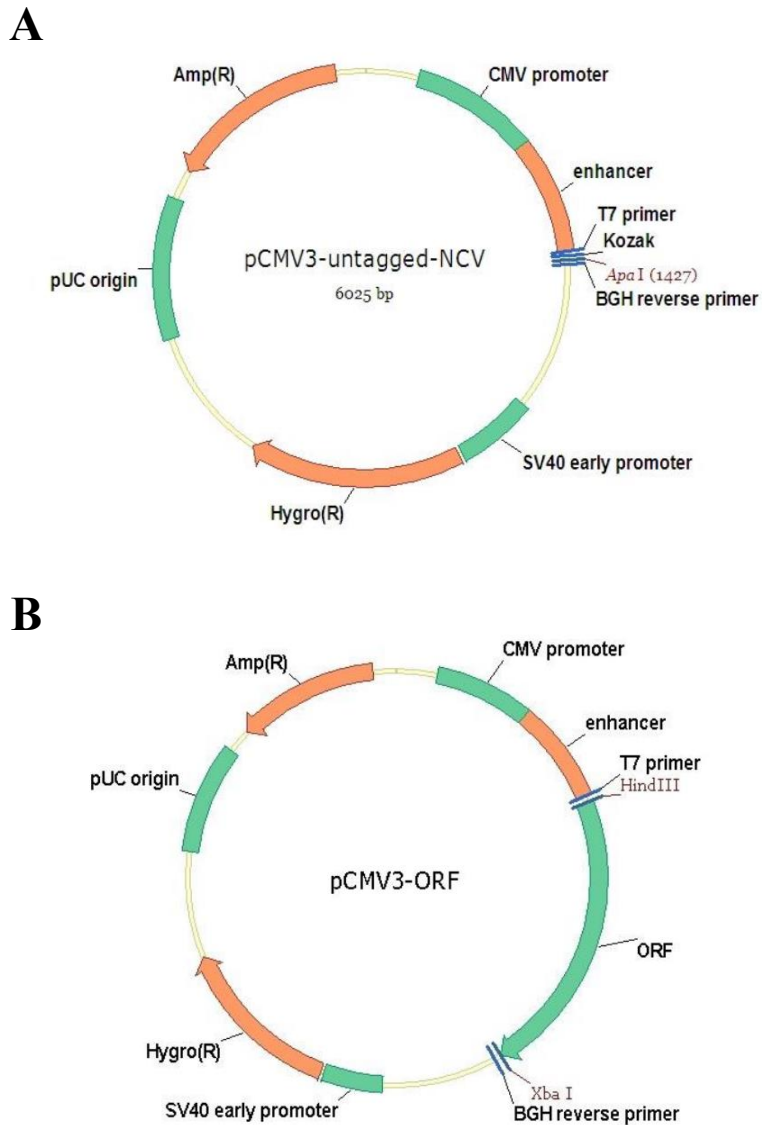


Figura 11. Representación gráfica del plásmido pCMV3 vacío (A) y pCMV3-ORF (B) que codifica los diferentes PTGERs utilizados para la generación de células CaSki transfectantes estables. Se utilizaron los plásmidos comerciales de la compañía Sino Biological, Inc (E.E.U.U.) que no codificaban ningún transgen (catálogo CV011; a) o los diversos cDNAs codificadores para los receptores PTGER1-4 clonados direccionalmente entre los sitios *Hind III* y *Xba I* y bajo el control del promotor fuerte del citomegalovirus (CMV) (b). Destaca en ambas construcciones el marcador “Hygro(R)” que permite la selección en células de mamífero. Los plásmidos utilizados para la sobreexpresión de los receptores PTGER1, 2, 3 y 4 fueron los vectores con los números de catálogo Sino Biological Inc HG18640-UT, HG17857-UT, HG17382-UT y HG17732-UT, respectivamente.

Para las transfecciones, las células CaSki parentales (500 000 células/pozo) fueron sembradas en cajas de 6 pozos en 2 mL de medio de siembra de células CaSki. Después de 24 h de incubación, las células fueron transfectadas con el reactivo Polyfect (Qiagen, Alemania) con 1 µg de cada uno de los plásmidos comerciales mostrados en la Tabla 1 y cuyos mapas físicos se presentan en la Figura 11.

Las 5 sublíneas CaSki transfectantes estables fueron seleccionadas con higromicina B 125 µg/mL. Las células transfectantes resistentes a este antibiótico fueron caracterizadas mediante qPCR y western blot para evaluar la expresión de cada transgen, así como también por su respuesta a la PGE₂ en términos de producción de AMPc como se describirá posteriormente.

Estudios de proliferación

Para estudiar el efecto de la PGE₂ sobre la proliferación de las células CaSki, se sembraron por sextuplicado 2000 células por pozo en 200 µL de medio de siembra en una caja de 96 pozos. De manera paralela, en cada experimento se incluyó una curva concentración respuesta con 0, 500, 1000, 1500, 2000 y 2500 células CaSki por pozo por triplicado. Las células se dejaron adherir a la placa durante 24 h, cada pozo fue lavado con 200 µL de solución salina balanceada de Hank (Gibco, E.E.U.U.) y posteriormente se aplicaron los tratamientos de PGE₂ (Cayman Chemical, E.E.U.U.) en diferentes concentraciones o etanol 0.1% como su vehículo en medio de tratamiento suplementado con SFB reducido en hormonas y factores de crecimiento [RPMI suplementado con suero fetal bovino descomplementado y tratado con carbón dextrán 5% y penicilina/estreptomicina 1% (Gibco, E.E.U.U.)]. Como control positivo de proliferación se realizaron incubaciones paralelas en presencia de 17β-estradiol 1×10^{-9} M (Sigma-Aldrich, E.E.U.U.). Las células se incubaron durante 6 días y posteriormente la proliferación celular se evaluó con el sistema “Cell Proliferation kit II (XTT)” [46] (Roche, Alemania). Cuando la proliferación celular se evaluó en las células CaSki transfectantes estables para los receptores PTGER, los medios de siembra y de tratamiento fueron adicionalmente suplementados con higromicina B 125 µg/mL (Gibco, E.E.U.U.). En todos los casos, el día del ensayo de proliferación, se reemplazó

el medio de cultivo con medio de siembra CaSki, a cada pozo se agregaron 50 μ L del reactivo XTT y se incubó a 37°C durante 2 h antes de efectuar las lecturas en un espectrofotómetro de placas a 492 nm (Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader, BioTek, E.E.U.U.). Los valores de concentración de PGE₂ que inhiben el 50% de la proliferación (CI₅₀) de las diferentes sublíneas CaSki fueron calculados de las curvas concentración-respuesta mediante un análisis de regresión no lineal ajustando los datos a una curva sigmoide con el programa Origin 9.0 (OriginLab Corporation, E.E.U.U.).

Estudios de expresión a nivel de RNA

Para realizar los estudios de expresión génica de este trabajo, se sembraron células CaSki a razón de 1.5 millones de células en 7 mL de medio de siembra en cajas Petri de 100 mm (o igual número de células en el caso de las transfectantes estables, pero en los correspondientes medios suplementados adicionalmente con higromicina B 125 μ g/mL). Después de que las células se adhirieran a la caja (24 h de incubación), se retiró el medio de siembra, se lavó con solución salina balanceada de Hank y las células fueron incubadas a 37°C durante 24 h con PGE₂ 1 x 10⁻⁹ M o con etanol 0.1% como su vehículo en medio de tratamiento suplementado con SFB reducido en hormonas y factores de crecimiento.

Una vez finalizada la incubación con los tratamientos, el medio se aspiró y se procedió al aislamiento del RNA total mediante el método descrito por Chomczynski y Sacchi [47]. Para ello, las células fueron tratadas con 1 mL del reactivo TRIzol (Invitrogen, E.E.U.U.) que contiene fenol e isotiocianato de guanidina para separar RNA, DNA y proteínas de las células. Posteriormente se adicionaron 0.25 mL de cloroformo frío y se agitó en vórtex para formar una emulsión. Las muestras fueron centrifugadas a 20800 x g durante 45 minutos a 4°C, de este modo se logró obtener una fase acuosa que contiene al RNA disuelto, una interfase donde se encuentra el DNA, y una fase orgánica que contiene proteínas y los demás componentes celulares. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, se agregó 1 mL de isopropanol frío, se agitó y se incubó 1 h a -70°C para precipitar al RNA y sales. Nuevamente las muestras fueron centrifugadas a 20800 x g durante 30 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se lavó con 1 mL de etanol 75% en agua tratada con pirocarbonato de dietilo (H₂O+DEPC) para disolver las sales remanentes. Después de una

última centrifugación a 20800 x g durante 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante, se dejaron secar las muestras y el RNA se disolvió en H₂O+DEPC. Las muestras fueron almacenadas a -70°C y para la cuantificación se utilizó un lector de placas multimodal (Synergy HT Biotek, Agilent E.E.U.U.) colocando 2 µL de muestra y midiendo en las longitudes de onda de 260/280 nm.

Para realizar la síntesis de DNA complementario (cDNA), se utilizó el kit *Maxima First Strand cDNA Synthesis for RT-qPCR* [48] (ThermoFisher Scientific, E.E.U.U.). Este kit consiste de dos componentes, un tubo que contiene una versión optimizada de la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney y el inhibidor de RNasas RiboLock; y el tubo de la mezcla de la reacción 5X que contiene el amortiguador, los 4 desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), el oligo (dT)₁₈ y una mezcla de hexámeros aleatorios. Cada cDNA se obtuvo a partir de 5 µg de RNA total siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA se preparó en un termociclador 9600 (Perkin Elmer, E.E.U.U.) con el siguiente programa: 25°C por 10 minutos para alinear las secuencias de los oligonucleótidos al RNA total, 50°C por 30 minutos para la transcripción inversa y 85°C por 5 minutos para destruir al RNA molde y a la transcriptasa reversa. Los cDNAs obtenidos fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

La expresión génica se evaluó mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) mediante el sistema de detección con sondas de hidrólisis tipo Taqman [49] (Universal Probe Library, Roche, Alemania). Las sondas Taqman son moléculas pequeñas de DNA de aproximadamente 8 nucleótidos que pueden hibridarse con secuencias complementarias en el DNA a ser amplificado. Una sonda Taqman contiene un fluoróforo en el extremo 5' y un apagador en el extremo 3'. En su forma intacta (libre o unida al DNA) una sonda Taqman no emite fluorescencia debido al bloqueo de la fluorescencia del fluoróforo por el apagador mediante un mecanismo FRET (Transferencia de Energía de Resonancia de Förster). Sin embargo, durante la amplificación por PCR, la actividad exonucleasa 5' a 3' de la *Taq* DNA polimerasa remueve el apagador y libera la sonda, la cual emite fluorescencia a 530 nm de manera proporcional a los amplicones en la reacción.

Las reacciones de amplificación se realizaron mediante el formato “hot start PCR” con el kit LightCycler 480 Probes Master que contiene a la *Taq* DNA polimerasa inactiva con un anticuerpo y que debe ser calentada para eliminar el anticuerpo y activar de esta manera a la

enzima. Las amplificaciones fueron realizadas en placas de 96 pozos en el equipo LightCycler 480 (Roche, Alemania). En este estudio la expresión génica de los receptores PTGER1-4, así como del canal de potasio EAG1, se evaluaron de forma relativa con respecto a la expresión constante del gen normalizador RPL32 (el gen de la proteína ribosomal L32).

Cada reacción de qPCR consistió de 2 μ L de cDNA, 2.5 μ L de agua libre de nucleasas, 0.2 μ L de cada uno de los oligonucleótidos 10 μ M (Tabla 2), 5 μ L de la mezcla de reacción 2X que contiene la *Taq* DNA polimerasa y 0.1 μ L de la respectiva sonda de hidrólisis (Tabla 2). En cada experimento se amplificó de manera paralela el gen RPL32 para normalizar los resultados.

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos y de las sondas de hidrólisis (Universal Probe Library) utilizadas en este estudio.

Gen	Número de acceso GenBank	Sonda	Secuencia (5' a 3')
RPL32	NM_000994	11	GAAGTTCCTGGTCCACAACG
			GAGCGATCTCGGCACAGTA
PTGER1	NM_000955	28	ATGGTGGTGTCTGCATCT
			CGCTGCAGGGAGGTAGAG
PTGER2	NM_000956	68	CCTGGCTATCATGACCATCAC
			GTTTCATTCATATATGCAAAAATCGT
PTGER3	NM_198719	38	TGATGTGGAGCGACCATT
			CAGGTGGGAAGAAATATGCAA
PTGER4	NM_000958	58	CTCCCTGGTGGTGCTCAT
			GGCTGATATAACTGGTTGACGA
EAG1 (KCNH1)	NM_002238	49	CCTGGAGGTGATCCAAGATG
			CCAAACACGTCTCCTTTTCC

El programa de amplificación fue el siguiente: 95°C durante 10 minutos para desnaturalizar el anticuerpo unido al sitio activo de la *Taq* DNA polimerasa; posteriormente 55 ciclos del siguiente programa (95°C/10 s para desnaturalizar el DNA, 60°C/30 s para la unión de los oligonucleótidos al DNA y 72°C/1 s para la síntesis del amplicón y para la toma de la lectura de fluorescencia a 530 nm).

Estudios de expresión a nivel de proteína

Para los estudios de western blot [50], se sembraron células CaSki a razón de 1.5 millones de células en 7 mL de medio de siembra en cajas Petri de 100 mm (o igual número de células en el caso de las transfectantes estables pero en los correspondientes medios suplementados adicionalmente con higromicina B 125 µg/mL). Después de que las células se adhirieran a la caja (24 h de incubación), se retiró el medio de siembra, se lavó con solución salina balanceada de Hank y las células fueron incubadas a 37°C durante 24 h con PGE₂ 1 x 10⁻⁹ M o con etanol 0.1% como su vehículo en medio de tratamiento suplementado con SFB reducido en hormonas y factores de crecimiento. Al finalizar la incubación, el medio se aspiró y las células de cada caja Petri se lavaron con 5 mL de solución salina balanceada de Hank.

Para la obtención de las proteínas se realizó la lisis de las células con amortiguador de radioinmunoprecipitación (amortiguador RIPA: fosfato de sodio dibásico 9.1 mM, fosfato de sodio monobásico 1.7 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P40 1%, SDS 0.1%, pH 7.4) suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete*, Roche, Alemania). La concentración de proteínas de cada extracto se determinó por el método del ácido bicinonínico (Pierce Thermo Scientific, E.E.U.U.) [51]. Las proteínas (60 µg por carril) fueron separadas mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 12% y transferidas a membranas de nitrocelulosa utilizando el sistema semiseco a temperatura ambiente (20 V durante 1.5 h; *Trans blot semi dry transfer system*, Bio-Rad, E.E.U.U.). Las membranas se bloquearon en leche descremada con colágeno al 5% en solución amortiguadora TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 50 mM; pH 8.0). Los anticuerpos y sus diluciones utilizadas se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en este estudio.

Anticuerpos primarios		
Anticuerpo	Marca (número de catálogo)	Dilución
Policlonal de conejo contra PTGER1 humano	Bioss (bs-6316R)	1:300
Policlonal de conejo contra PTGER2 humano	Bioss (bs-4196R)	1:300
Policlonal de conejo contra PTGER3 humano	Bioss (bs-1876R)	1:300
Policlonal de conejo contra PTGER4 humano	Bioss (bs-8538R)	1:300
Monoclonal de ratón contra GAPDH humana	Santa Cruz Biotechnology (sc-365062)	1:2000
Anticuerpos secundarios		
Anti-inmunoglobulinas IgG de conejo hecho en ratón y acoplado a peroxidasa de rábano (HRP)	Santa Cruz Biotechnology (sc-2357)	1:1000
Proteína de unión a IgG k de ratón acoplado con peroxidasa de rábano (HRP)	Santa Cruz Biotechnology (sc-516102)	1:1000

Las proteínas de interés fueron detectadas mediante un kit de quimioluminiscencia (*Pierce ECL Western Blotting Substrate*, Thermo Scientific, E.E.U.U.) mediante un equipo *Molecular Imager ChemiDoc XRS System* y el programa *Image Lab Software* (Bio-Rad, E.E.U.U.).

Cuantificación de AMP cíclico total

Para evaluar la activación funcional de los receptores PTGER2, PTGER3 y PTGER4 por la PGE₂ en las correspondientes células CaSki transfectantes estables, evaluamos la acumulación de AMP cíclico (AMPC) mediante un sistema comercial [52]. Para ello, se sembraron 300 000 células (CaSki PCMV3, CaSki PTGER2, CaSki PTGER3 y CaSki PTGER4) en cajas de 6 pozos en un mL de medio de siembra de células transfectantes estables suplementado con higromicina B 125 µg/mL. Después de 72 h de incubación, se retiró el medio de siembra, se lavó con solución salina balanceada de Hank y las células

fueron incubadas durante 24 h a 37°C con PGE₂ 1 x 10⁻⁹ M o con etanol 0.1% como su vehículo en medio de tratamiento de células transfectantes estables suplementado con higromicina B 125 µg/mL y adicionado con 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 0.1 mM como inhibidor de fosfodiesterasas [53]. Incubaciones paralelas se llevaron a cabo con células CaSki parentales, pero utilizando los correspondientes medios de cultivo sin higromicina B. Transcurrido el tiempo, se extrajo el AMP cíclico total de cada pozo mediante tratamiento con HCl 0.1N. El contenido de AMPc se determinó en las muestras acetiladas con anhídrido acético utilizando un sistema comercial (Cyclic AMP ELISA Kit, Cayman Chemical, E.E.U.U.). La determinación de las proteínas se determinó por el método del ácido bicinconínico (Pierce Thermo Scientific, E.E.U.U.) [51].

Actividad de transactivación de la región promotora del gen EAG1 por la PGE₂ en las células CaSki

Para estudiar la capacidad de la PGE₂ de modificar la actividad de la región promotora del gen EAG1 utilizamos el plásmido comercial que se encuentra esquematizado en la Figura 12, el cual fue transfectado de manera transitoria a células CaSki. Para ello, se sembraron células CaSki (300 000 células/pozo) en cajas de 6 pozos en 2 mL de medio de siembra de células CaSki. Después de 24 h de la siembra, las células fueron transfectadas con el reactivo Polyfect (Qiagen, Alemania) con 1 µg del plásmido reportero. Después de 24 h de incubación, las células se lavaron con solución salina balanceada de Hank y fueron incubadas a 37°C durante 24 h o 48 h con PGE₂ 1 x 10⁻⁹ M o con etanol 0.1% como su vehículo en medio de tratamiento suplementado con SFB reducido en hormonas y factores de crecimiento. A los tiempos indicados, se tomó una alícuota de medio de cultivo, la cual fue utilizada para la determinación de las actividades enzimáticas de la luciferasa de *Gaussia princeps* (Gluc) y de la fosfatasa alcalina de secreción (SEAP) mediante un sistema comercial (Secrete-Pair Dual Luminiscence Assay Kit (Genecopoeia, cat. LF031) utilizando un luminómetro Turner 20/20. Los resultados de este ensayo se expresaron como el cociente de las actividades de Gluc respecto a las de SEAP.

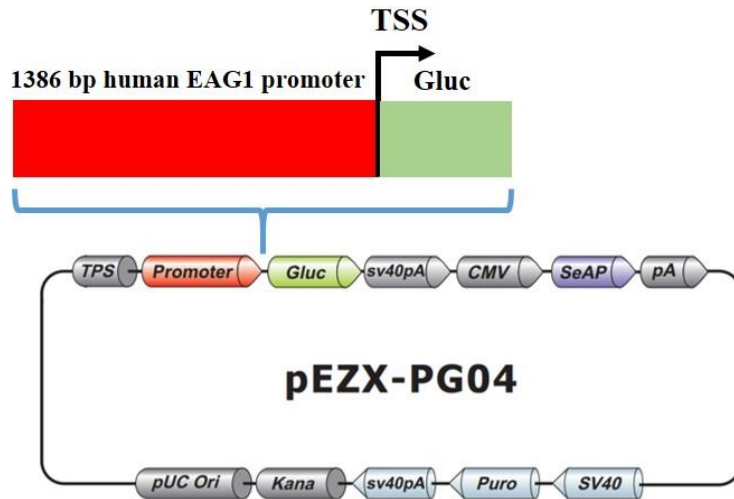


Figura 12. Representación gráfica del plásmido pEZX-PG04 que contiene 1386 pb del promotor proximal del gen EAG1 humano. Se utilizó el plásmido comercial de la compañía Genecopoeia (E.E.U.U; catálogo HPRM44182-PG04), que codifica para la luciferasa de *Gaussia princeps* (Gluc) bajo el control del promotor proximal del gen EAG1 humano y que también codifica para la fosfatasa alcalina de secreción (SEAP) bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV).

Análisis estadístico

Se utilizó la prueba *t* de Student para muestras independientes y las diferencias fueron consideradas significativas (*) con una $P < 0.05$. Los datos se muestran como el promedio \pm la desviación estándar y en general consideran el resultado de tres experimentos independientes con al menos tres réplicas experimentales.

Resultados

En primera instancia evaluamos el efecto de la PGE₂ sobre la proliferación de las células CaSki. De manera sorprendente, observamos que la proliferación de las células CaSki es significativamente inhibida por concentraciones subnanomolares de PGE₂ (Figura 13). De los datos de esta curva concentración respuesta encontramos que la concentración efectiva para lograr el 50% del efecto antiproliferativo (CI₅₀) fue de 5.74×10^{-9} M.

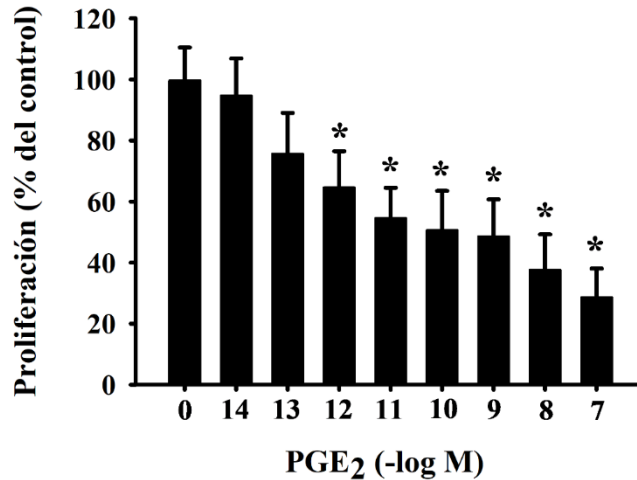


Figura 13. La proliferación de las células CaSki es inhibida significativamente por la PGE₂. Las células CaSki (2000 células/pozo) fueron sembradas en medio RPMI suplementado en cajas de 96 pozos y después de 24 h de la siembra fueron incubadas en presencia de diferentes concentraciones de PGE₂ o etanol 0.1% como su vehículo durante 6 días. La proliferación celular se evaluó mediante el sistema XTT. Cada barra muestra el porcentaje de la proliferación respecto al vehículo (0). Los resultados corresponden a la media +/- la desviación estándar de 3 experimentos independientes, cada uno con 6 réplicas experimentales. *P<0.05 vs. vehículo.

Para confirmar que estos resultados no fueran un artificio experimental, evaluamos el efecto del 17β-estradiol (β-estradiol) sobre la proliferación de las células CaSki, el cual incrementa la proliferación de diferentes líneas celulares de cáncer cervical, incluyendo a las células CaSki [54]. Los resultados de la Figura 14 muestran que efectivamente el β-estradiol incrementa significativamente la proliferación de las células CaSki y nos sugieren que el efecto inhibitorio de la PGE₂ sobre la proliferación de las células CaSki (Figura 13) no es un artificio experimental.

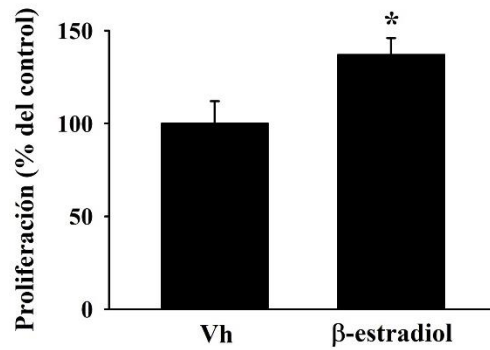


Figura 14. El β -estradiol incrementa significativamente la proliferación de las células CaSki. Las células CaSki (2000 células/pozo) fueron sembradas en medio RPMI suplementado en cajas de 96 pozos y después de 24 h de la siembra fueron incubadas en presencia de β -estradiol (1×10^{-9} M) o etanol 0.1% como vehículo durante 6 días. La proliferación celular se evaluó mediante el sistema XTT. Cada barra muestra el porcentaje de la proliferación respecto al vehículo. Los resultados corresponden a la media \pm la desviación estándar de 3 experimentos independientes, cada uno con 6 réplicas experimentales. * $P < 0.05$ vs. vehículo.

Los resultados de la Figura 13 nos plantearon muchas interrogantes respecto al papel de la PGE_2 y sus receptores en la proliferación de las células CaSki. Tomando en cuenta que el canal de potasio EAG1 incrementa su expresión génica de manera proporcional a la tasa de proliferación de diversas células tumorales, investigamos el efecto de la PGE_2 sobre la expresión del canal EAG1 en las células CaSki. La Figura 15 muestra que la PGE_2 disminuye significativamente la expresión génica del canal EAG1 respecto al vehículo a las 48 h de incubación mientras el tratamiento con 24 h no tuvo efecto alguno. Estos resultados correlacionan con los datos de transactivación de la región promotora del gen EAG1 presentados en la Figura 16. En efecto, la PGE_2 suprime significativamente la actividad transcripcional del promotor EAG1 a las 48 h sin presentar cambios a las 24 h (Figura 16).

Posteriormente nos interesamos en evaluar qué subtipos de receptores PTGER se expresan en las células CaSki, así como el efecto de la PGE_2 sobre la expresión de cada uno de ellos mediante qPCR y western blot, respectivamente.

La Figura 17 muestra que las células CaSki expresan los transcritos para los cuatro receptores PTGER y que la PGE_2 no tiene efecto sobre sus niveles de expresión. Entre los 4 receptores

PTGER, los transcritos más abundantes son los de PTGER1 y PTGER3, seguido por PTGER4 y PTGER2 que es el de menor expresión relativa.

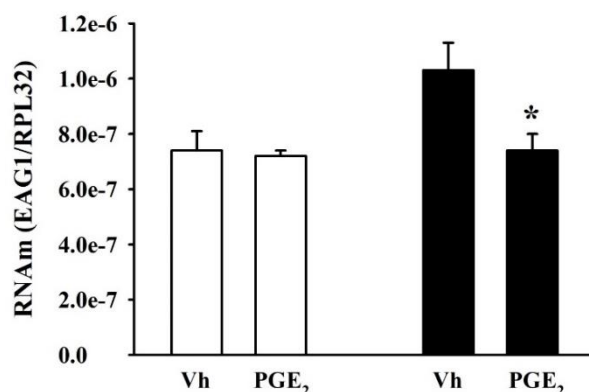


Figura 15. Efecto de la PGE₂ sobre la expresión génica del canal de potasio EAG1 en las células CaSki. Las células CaSki cultivadas durante 24 h fueron tratadas en presencia de PGE₂ 1x10⁻⁹ M o etanol 0.1% como vehículo (Vh). Después de 24 h (barras blancas) o de 48 h (barras negras) de incubación, se purificó el RNA total y la expresión del gen EAG1 se evaluó por qPCR. Las barras representan el promedio de 2 experimentos independientes (cada uno con 3 réplicas experimentales) +/- la desviación estándar de cada expresión génica normalizada contra el gen constitutivo RPL32. *P<0.05 vs. respectivo vehículo.

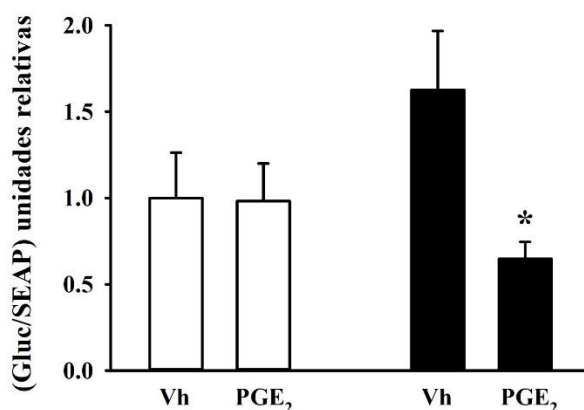


Figura 16. Efecto de la PGE₂ sobre la transactivación del promotor del gen del canal de potasio EAG1 en las células CaSki. Las células fueron transfectadas con un vector reportero que contenía el promotor EAG1 y tratadas en presencia de PGE₂ 1x10⁻⁹ M o etanol 0.1% como vehículo (Vh). Después de 24 h (barras blancas) o de 48 h (barras negras) de incubación, se tomaron alícuotas del medio de cultivo y la transactivación del promotor EAG1 se evaluó mediante un ensayo luminiscente. Las barras representan el promedio de 2 experimentos independientes (cada uno con 3 réplicas experimentales) +/- la desviación estándar de los cocientes de las actividades enzimáticas de la luciferasa de *Gaussia* (Gluc) respecto a la de la fosfatasa alcalina de secreción (SEAP). *P<0.05 vs. respectivo vehículo.

La Figura 18 presenta la expresión de los 4 diferentes receptores mediante western blot. De manera similar a lo mostrado en la Figura 17 a nivel de RNAm, la Figura 18 nos indica que los receptores PTGER1, PTGER3 y PTGER4 se expresan abundantemente en las células CaSki y que el receptor PTGER2 presenta muy bajos niveles de expresión. Este mismo patrón de expresión de los receptores PTGERs se observó en las células HeLa, las cuales fueron utilizadas como un control positivo de la reactividad de los anticuerpos utilizados (Figura 18).

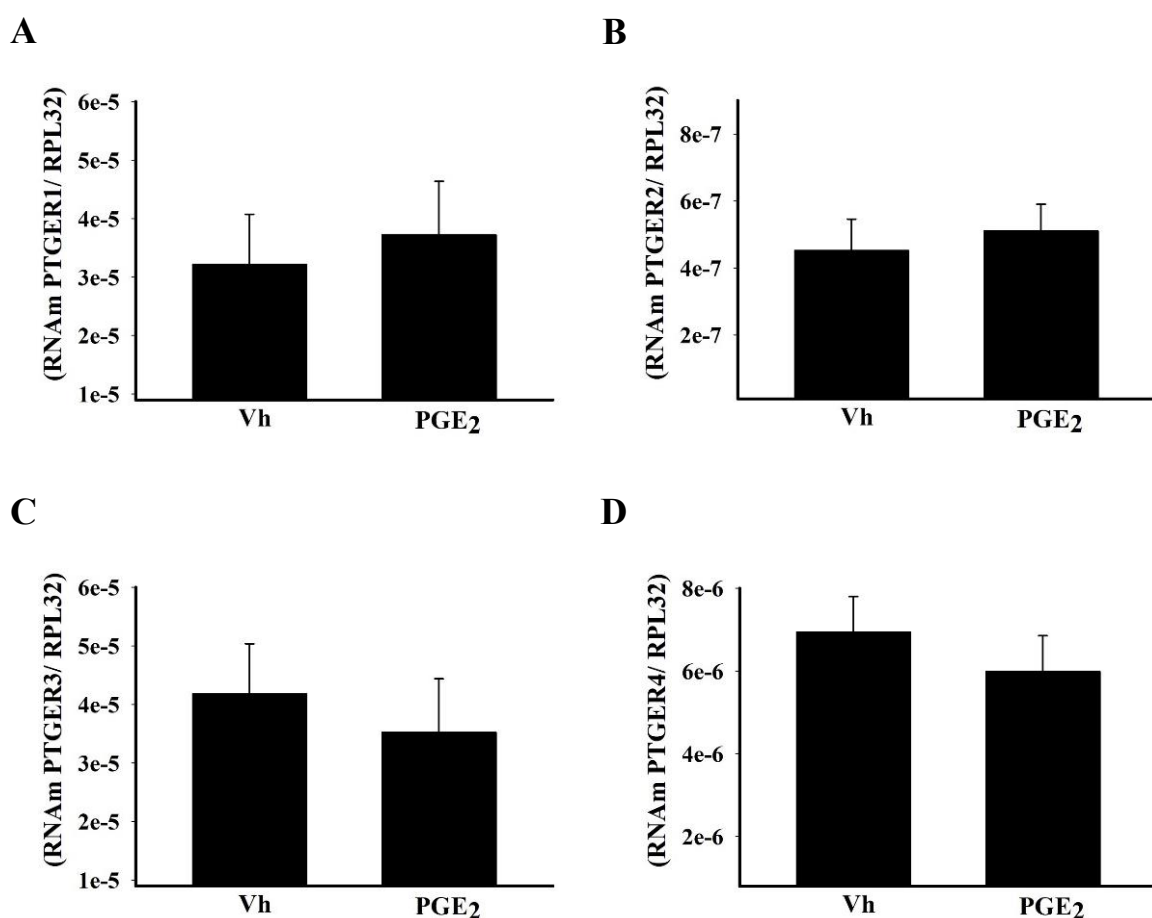


Figura 17. Efecto de la PGE₂ sobre la expresión génica de los cuatro receptores PTGER en las células CaSki. Las células CaSki cultivadas durante 24 h fueron tratadas en presencia de PGE₂ 1x10⁻⁹ M o etanol 0.1% como vehículo (Vh). Después de 24 h de incubación, se purificó el RNA total y la expresión de los genes PTGER1 (A), PTGER2 (B), PTGER3 (C) y PTGER4 (D) se evaluó por qPCR. Las barras representan el promedio de 3 experimentos independientes (cada uno con al menos 3 réplicas experimentales) +/- la desviación estándar de cada expresión génica normalizada contra el gen constitutivo RPL32.

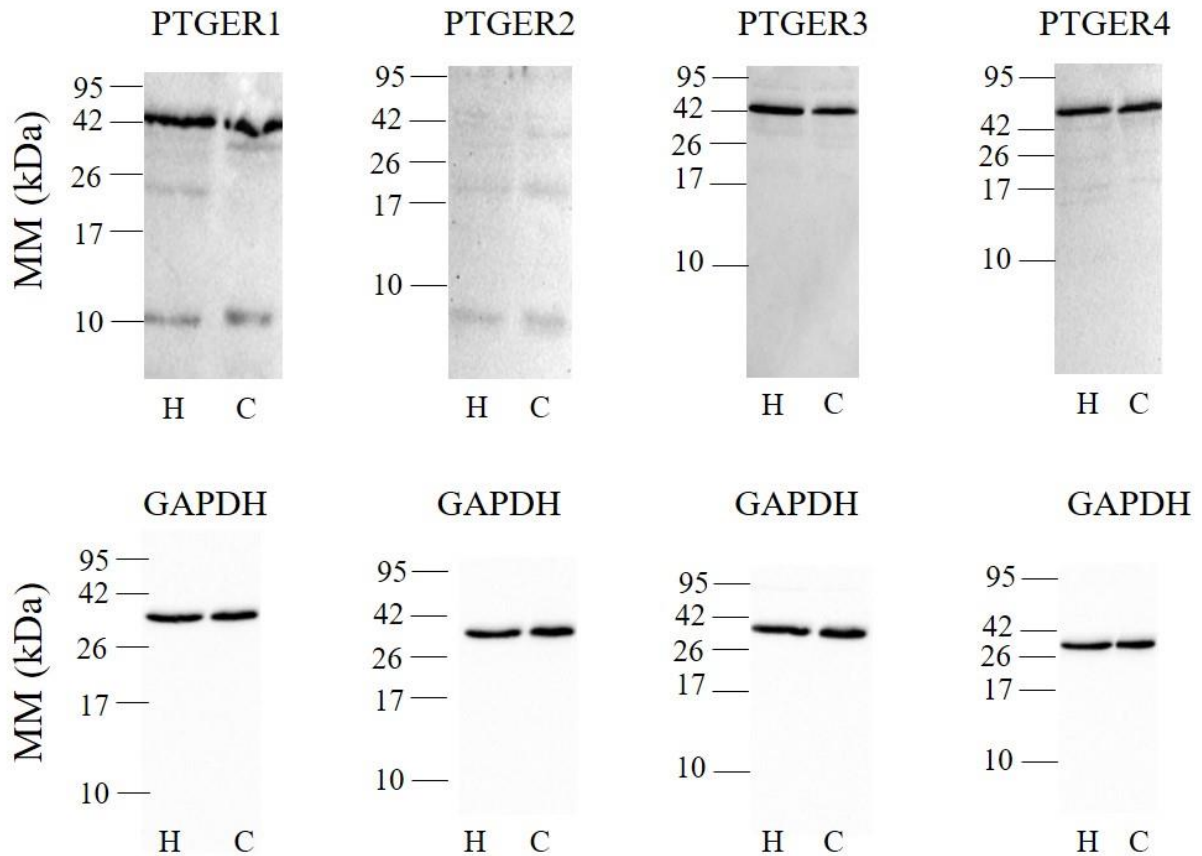


Figura 18. Los cuatro receptores para la PGE₂ se expresan en las células CaSki. Se utilizaron 60 µg de proteínas totales por carril de células CaSki (C) o células HeLa (H) como control positivo de la inmunoreactividad de los anticuerpos. Se muestran membranas representativas de western blot para cada uno de los receptores PTGER en la parte superior y las mismas membranas reincubadas contra el anticuerpo anti GAPDH como control de carga. Las masas moleculares de PTGER1, PTGER2, PTGER3 y PTGER4 son 42 kDa, 40 kDa, 43 kDa y 53 kDa, respectivamente. La masa molecular de la GAPDH es de 36 kDa.

Para estudiar el papel de cada receptor PTGER sobre la proliferación de las células CaSki decidimos utilizar la estrategia de ganancia de función. Para ello, generamos 5 sublíneas de células CaSki transfectantes estables para cada uno de los receptores PTGER, así como una sublínea control. Cada sublínea CaSki fue generada mediante transfección de un plásmido que codifica a un receptor PTGER y como control, una sublínea CaSki transfectada solamente con el vector de expresión vacío (Tabla 1 y Figura 11).

Las células transfectantes resistentes a este antibiótico fueron caracterizadas mediante qPCR para evaluar la expresión génica de cada transgen como se muestra en la Figura 19. Se observa que al comparar con las células CaSki PCMV3 (transfectada con el plásmido vacío), todas las células transfectantes estables expresan altos niveles de RNAm a partir de los vectores de expresión correspondientes.

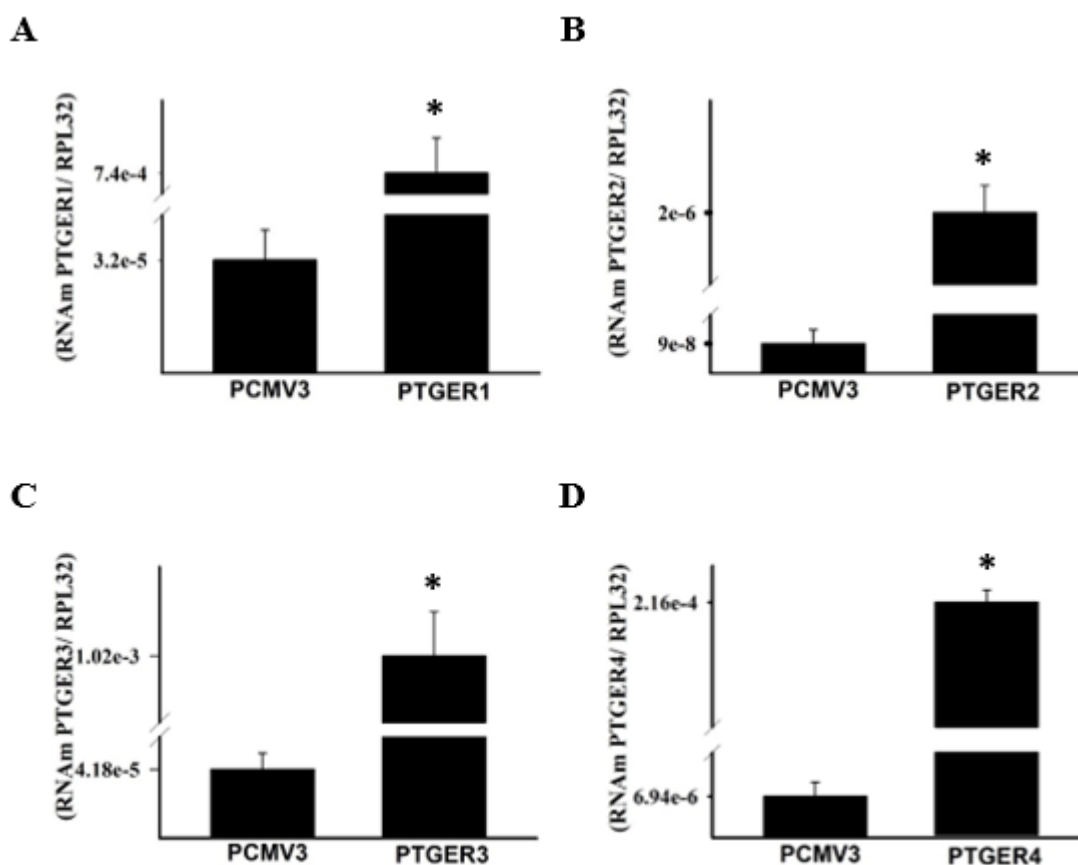


Figura 19. Los mRNAs de los distintos receptores PTGER se encuentran elevados en las correspondientes células transfectantes estables respecto a las células control. Las diferentes sublíneas de células CaSki transfectantes estables cultivadas durante 24 h fueron incubadas en medio suplementado con higromicina 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Después de 24 h de incubación se obtuvo el RNA total y la expresión de los genes PTGER1 (A), PTGER2 (B), PTGER3 (C) y PTGER4 (D) se evaluó por qPCR. Las barras representan el promedio de 3 experimentos independientes (cada uno con al menos 3 réplicas experimentales) \pm la desviación estándar de cada expresión génica normalizada contra el gen constitutivo RPL32. * $P < 0.05$ vs. PCMV3.

La Figura 20 muestra que todas las células CaSki transfectantes estables expresan en mayor medida el receptor PTGER que se encuentra transfectado con respecto a las células CaSki que solo poseen el plásmido vacío transfectado.

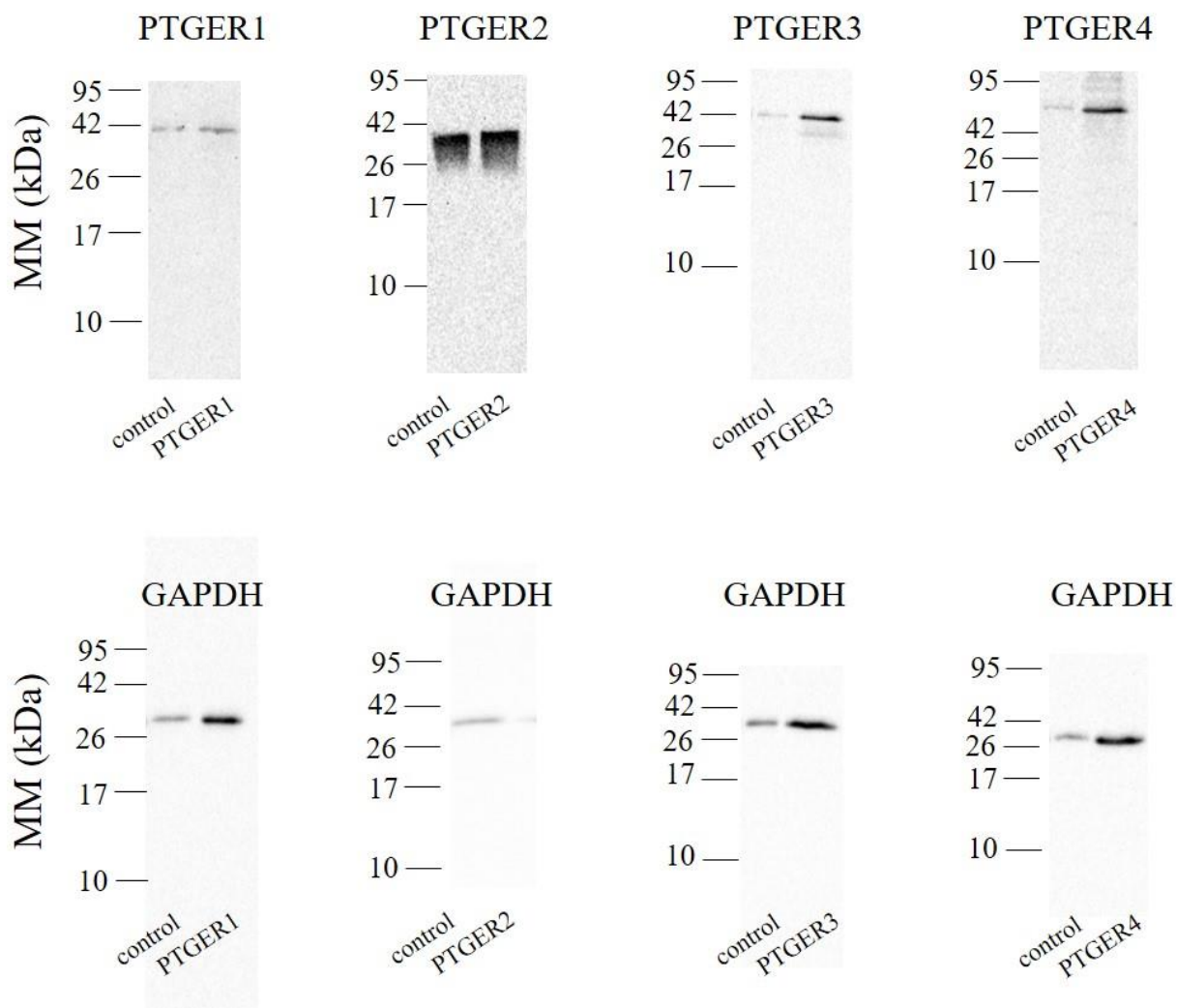


Figura 20. Validación por western blot de las células CaSki transfectantes estables. Se utilizaron 60 μ g de proteínas totales por carril de células CaSki PCMV3 que solo poseen el plásmido vacío (control) o las diferentes sublíneas CaSki transfectantes estables. Se muestran membranas representativas de western blot para cada uno de los receptores PTGER en la parte superior y las mismas membranas reincubadas contra el anticuerpo anti GAPDH como control de carga. Las masas moleculares de PTGER1, PTGER2, PTGER3 y PTGER4 son 42 kDa, 40 kDa, 43 kDa y 53 kDa, respectivamente. La masa molecular de la GAPDH es de 36 kDa.

También se evaluó la acumulación intracelular de AMPc en las diferentes células transfectantes estables (excepto en las células CaSki que sobreexpresan al receptor PTGER1 porque tal receptor no provoca cambios en este segundo mensajero). Los resultados de tal estudio se presentan en la Figura 21, en el cual se observa un incremento significativo de la producción de AMPc en las células CaSki PTGER2 y CaSki PTGER4. Las células CaSki parentales también mostraron un incremento significativo en la producción de AMPc, al igual que las células transfectantes controles (CaSki PCMV3). La Figura 21 también mostró que la PGE₂ no provocó cambios en la acumulación de AMPc en las células CaSki PTGER3. Con los datos de validación de las transfectantes estables mostrados en las figuras 19, 20 y 21, procedimos a los estudios de proliferación celular.

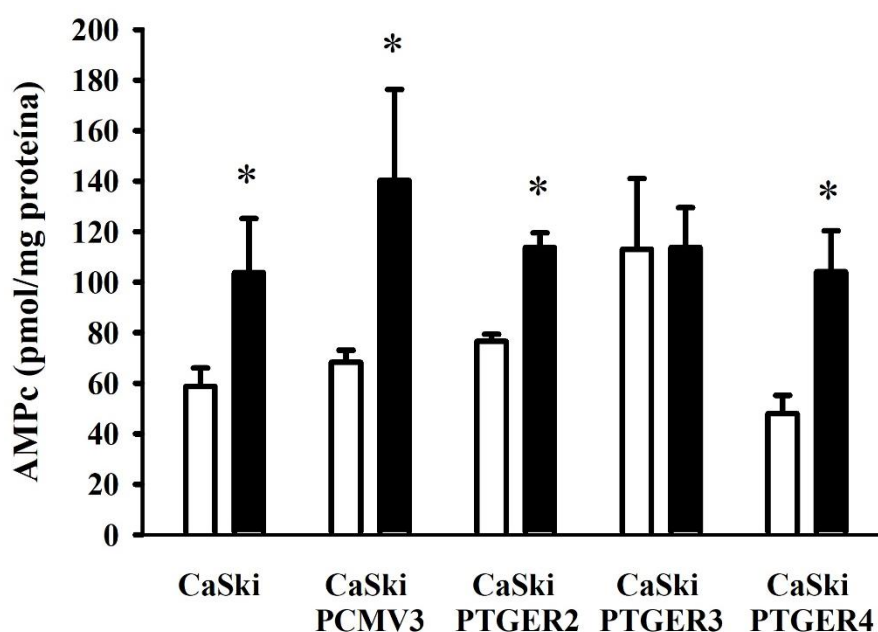
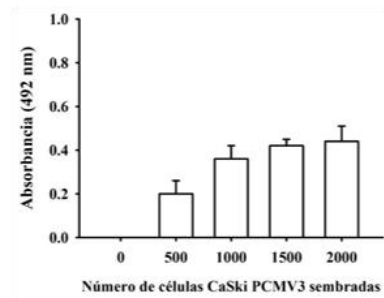
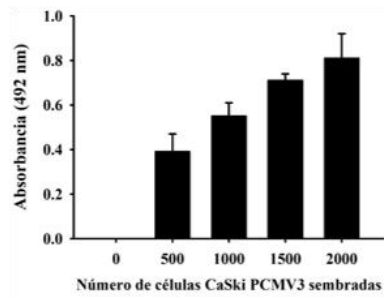
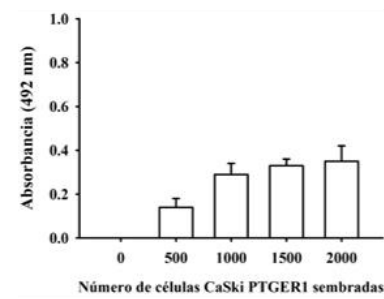
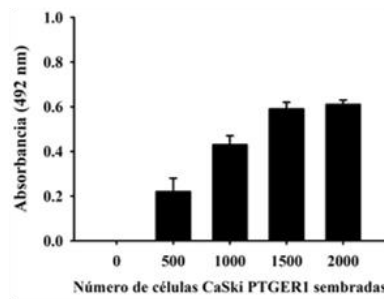
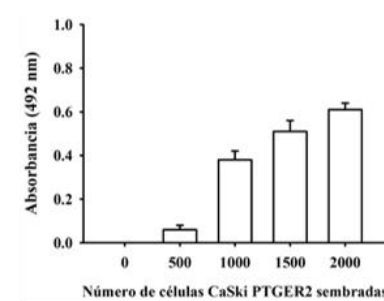
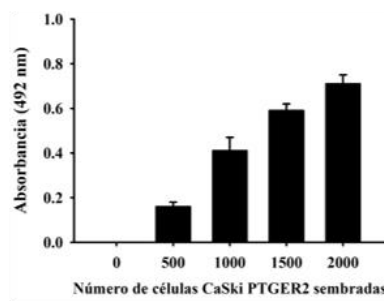
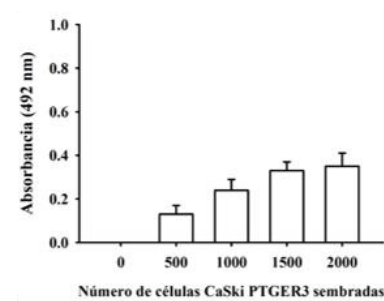
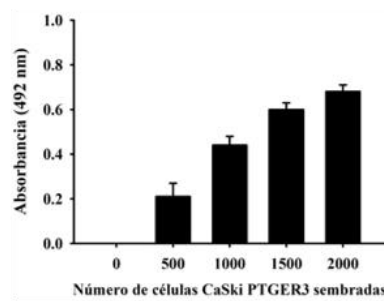
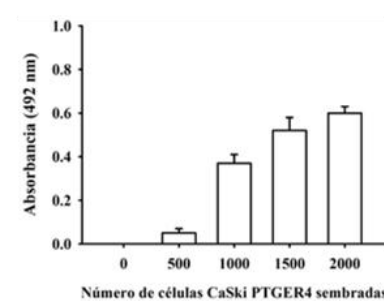
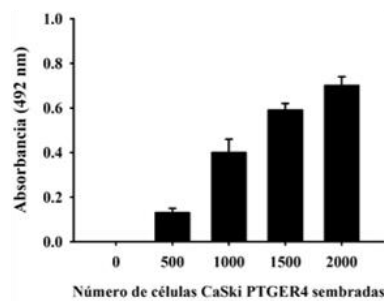


Figura 21. Acumulación de AMPc por efecto de la PGE₂ en las células CaSki parentales y transfectantes estables. Las células se sembraron en cajas de 6 pozos a razón de 300 000 células/pozo en su respectivo medio y 72 h después de la siembra fueron incubadas en presencia de PGE₂ 1 x 10⁻⁹ M (barras negras) o etanol 0.1% como su vehículo (barras blancas) durante 24 h en presencia de IBMX 0.1 mM como inhibidor de fosfodiesterasas. La producción de AMPc se determinó con el sistema comercial Cayman Cyclic AMP ELISA en extractos totales acetilados. Se presentan los datos de la producción de AMPc respecto a la proteína total. Los resultados corresponden a la media +/- la desviación estándar de un experimento con 3 réplicas experimentales. *P<0.05 vs. vehículo respectivo.

Dado que los experimentos de proliferación celular generalmente se realizan en medios de cultivo restringidos en factores de crecimiento y de esteroides, quisimos corroborar que todas las transfectantes pudieran crecer bajo estas condiciones restrictivas de cultivo en comparación con las condiciones normales de crecimiento.

Como se observa en la Figura 22, las cuatro sublíneas CaSki transfectantes estables incrementaron su proliferación de manera dependiente del número de células sembradas tanto en condiciones normales de crecimiento (con suero fetal bovino 5%) o en condiciones reducidas de factores de crecimiento (con suero fetal bovino tratado con carbón dextrán 5%). Sin embargo, las células crecieron más en presencia de condiciones normales de cultivo en comparación con las condiciones de restricción (Figura 22).

Figura 22 (próxima página). Curvas concentración respuesta de la proliferación de las sublíneas CaSki transfectantes estables. Diferente número de células CaSki PCMV3 (A), CaSki PTGER1 (B), CaSki PTGER2 (C), CaSki PTGER3 (D) y CaSki PTGER4 (E) fueron sembradas en cajas de 96 pozos en medio de siembra (medio RPMI + suero fetal bovino 5% + penicilina/estreptomicina 1 % + higromicina B 125 µg/mL). Después de 24 h de cultivo, las células se lavaron con solución salina y a una parte de ellas se les readicionó medio de siembra (barras negras) o medio reducido en factores de crecimiento (medio RPMI + suero fetal bovino tratado con carbón dextrán 5% + penicilina/estreptomicina 1 % + higromicina B 125 µg/mL, barras blancas). La proliferación celular se evaluó 6 días después del cambio de medio mediante el sistema XTT. Cada barra muestra el valor de la absorbancia del formazán a 492 nm. Los resultados corresponden a la media +/- la desviación estándar de 3 experimentos independientes, cada uno con 6 réplicas experimentales.

A**B****C****D****E**

La Figura 23 muestra que el β -estradiol sigue incrementando significativamente la proliferación de las células CaSki independientemente de la sobreexpresión de los receptores para la PGE₂.

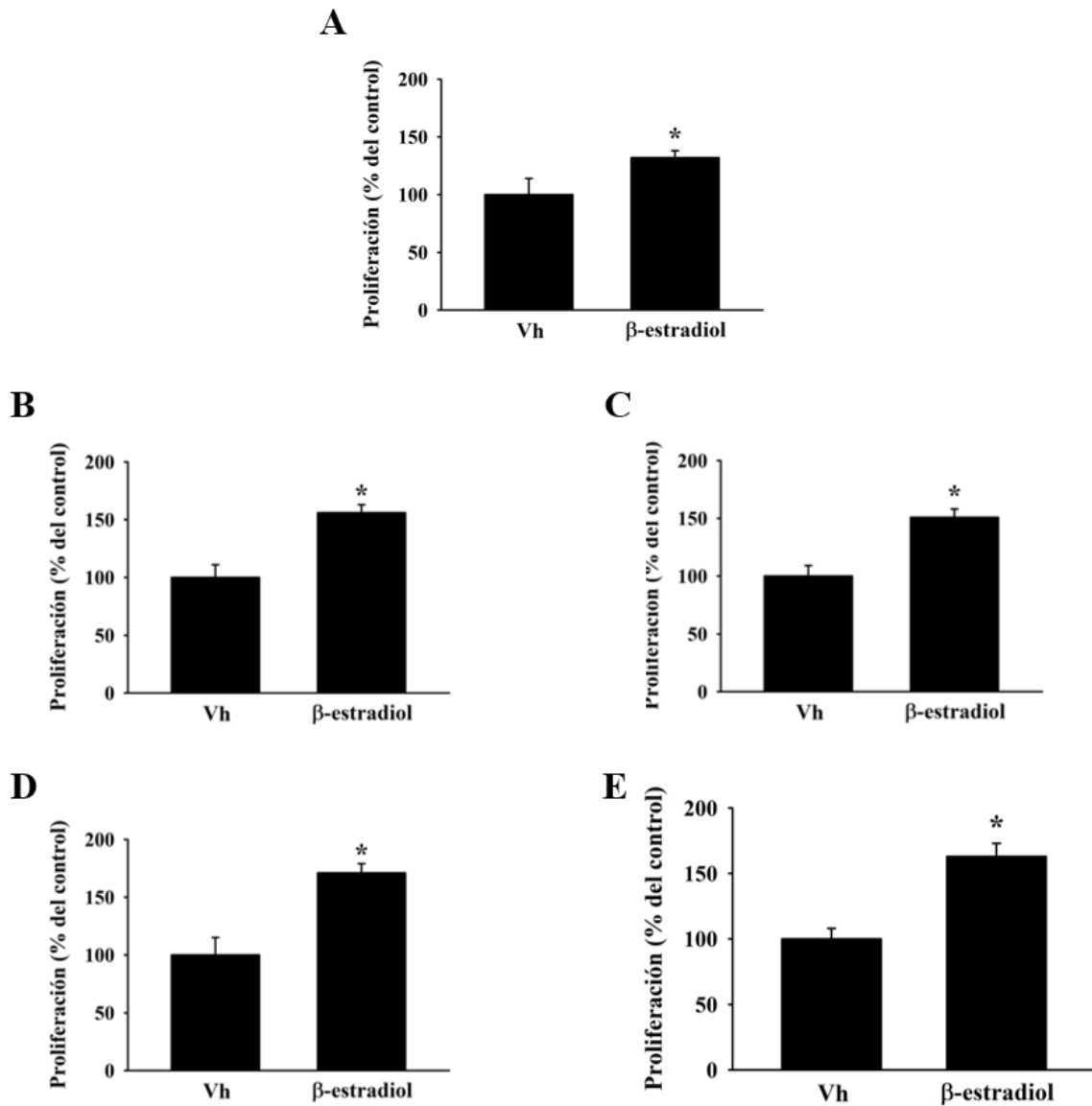


Figura 23. El β -estradiol incrementa la proliferación de las cuatro transfectantes estables CaSki PTGER. Las sublíneas CaSki PCMV3 (A), CaSki PTGER1 (B), CaSki PTGER2 (C), CaSki PTGER3 (D) y CaSki PTGER4 (E) (2000 células/pozo) fueron sembradas en medio RPMI suplementado con higromicina 125 μ g/mL en cajas de 96 pozos y después de 24 h de la siembra fueron incubadas en presencia de β -estradiol (1×10^{-9} M) o etanol 0.1% como vehículo durante 6 días. La proliferación celular se evaluó mediante el sistema XTT. Cada barra muestra el porcentaje de la proliferación respecto al vehículo. Los resultados corresponden a la media \pm la desviación estándar de 3 experimentos independientes, cada uno con 6 réplicas experimentales. *P<0.05 vs. vehículo.

La Figura 24A muestra que la proliferación de las células CaSki transfectantes controles que solo poseen el plásmido vacío (CaSki PCMV3) es inhibida de una manera dependiente de la concentración de PGE₂, siendo significativa la inhibición a partir de PGE₂ 1 x 10⁻¹³ M de una manera similar a lo que ocurre en las células CaSki parentales (Figura 13). Las Figuras 24B, C y E muestran que el efecto de la PGE₂ sobre la proliferación celular tienen el mismo patrón que lo observado en las células CaSki PCMV3 controles; sin embargo, el efecto inhibitorio de la PGE₂ sobre la proliferación es más pronunciado en las células CaSki PTGER2. La Figura 24C muestra que las células CaSki PTGER3 tratadas con PGE₂ solamente presentan inhibición significativa de la proliferación a concentraciones mayores a 1 nM.

De los datos de la Figura 24, se obtuvieron los valores de concentración de PGE₂ que inhiben el 50% de la proliferación (CI₅₀) de las diferentes sublíneas CaSki (Tabla 4). De acuerdo a los resultados, los mayores efectos inhibitorios de la PGE₂ se observaron en las células CaSki transfectadas con los receptores PTGER2 y PTGER4, seguido por las células CaSki PCMV3, CaSki PTGER1 y CaSki PTGER3.

Tabla 4. Concentraciones de PGE₂ que inhiben el 50% de la proliferación (CI₅₀) de las células CaSki.

Sublínea transfectante estable	CI ₅₀
CaSki PCMV3	5.4 x 10 ⁻¹⁰ M
CaSki PTGER1	5.8 x 10 ⁻⁹ M
CaSki PTGER2	5.04 x 10 ⁻¹¹ M
CaSki PTGER3	2.2 x 10 ⁻⁸ M
CaSki PTGER4	3.7 x 10 ⁻¹¹ M

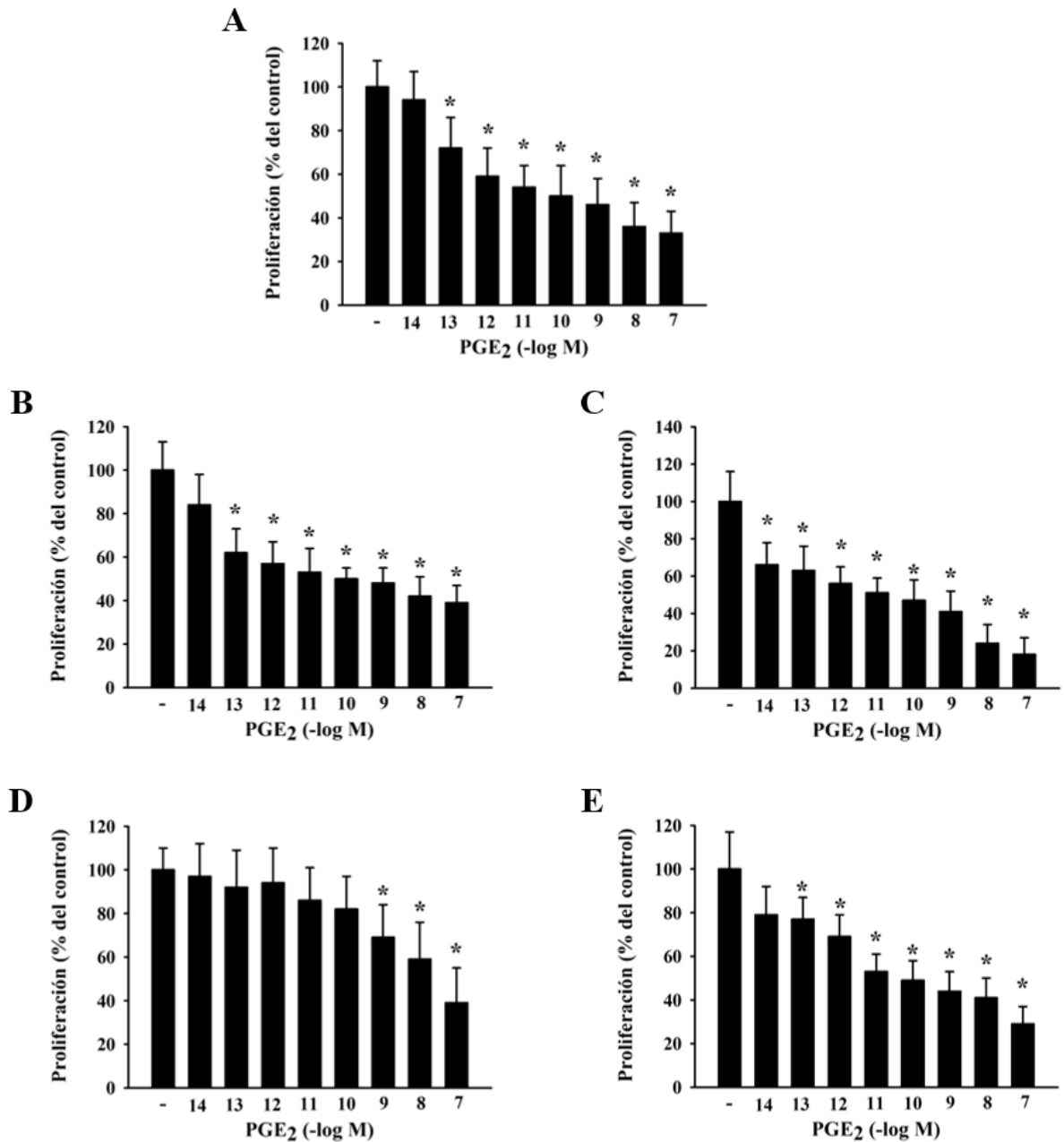


Figura 24. La PGE₂ inhibe la proliferación de las células CaSki a través de los 4 receptores PTGERs. Las sublíneas CaSki PCMV3 (A), PTGER1 (B), PTGER2 (C), PTGER3 (D) y PTGER4 (E) (2000 células/pozo) fueron sembradas en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino 5% tratado con carbón dextrán en cajas de 96 pozos y después de 24 h de la siembra fueron incubadas en presencia de diferentes concentraciones de PGE₂ o etanol 0.1% como vehículo (-) durante 6 días. La proliferación celular se evaluó mediante el sistema XTT. Cada barra muestra el porcentaje de la proliferación respecto al vehículo. Los resultados corresponden a la media +/- la desviación estándar de 3 experimentos independientes, cada uno con 6 réplicas experimentales. *P<0.05 vs. vehículo.

El último experimento de este trabajo consistió en la evaluación del efecto de la PGE₂ en la expresión gen EAG1 en las diversas sublíneas transfectantes estables CaSki. Como se observa en la Figura 25 y de manera similar a lo que ocurre en las células CaSki parentales a las 24 h (Figura 15), la PGE₂ no afectó la expresión génica del canal EAG1 en las células CaSki PCMV3 a las 24 h de tratamiento.

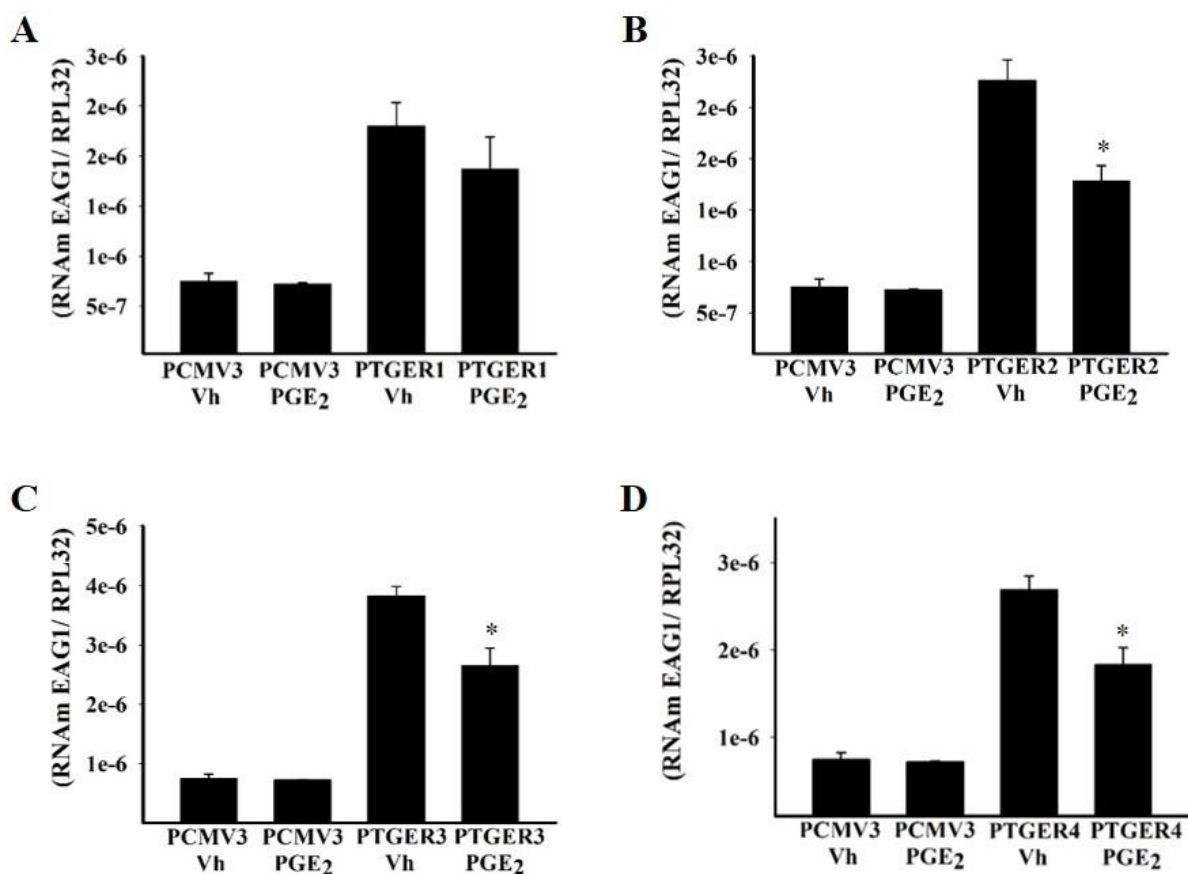


Figura 25. La activación de los receptores PTGER2, PTGER3 y PTGER4 reprime significativamente la expresión del gen EAG1 en las células CaSki. Las diferentes sublíneas de células CaSki transfectantes estables cultivadas durante 24 h fueron tratadas en presencia de PGE₂ 1x10⁻⁹ M o etanol 0.1% como vehículo (Vh) en medio suplementado con higromicina 125 µg/mL. Después de 24 h de incubación, se purificó el RNA total y la expresión del gen EAG1 se evaluó por qPCR. Las barras representan el promedio de 3 experimentos independientes (cada uno con al menos 3 réplicas experimentales) +/- la desviación estándar de cada expresión génica normalizada contra el gen constitutivo RPL32.

De manera interesante, a este tiempo corto (24 h) la PGE₂ disminuyó significativamente la expresión del oncogen EAG1 en las células CaSki transfectantes estables para los receptores PTGER2,3 y 4 y se nota una tendencia no significativa en las células PTGER1 (Figura 25).

Por falta de tiempo no se realizaron los experimentos a 48 h de tratamiento con PGE₂ ni los experimentos de transactivación del promotor EAG1 en las diferentes células transfectantes estables tratadas con PGE₂.

Discusión

La PGE₂ puede tener diversos efectos en diferentes tipos de cáncer y en el contexto del cáncer cervicouterino, existen pocos reportes respecto a sus funciones. Por ello, el presente estudio se llevó a cabo para indagar la relación de la PGE₂ y sus receptores en un modelo *in vitro* de cáncer cervicouterino: las células CaSki. Esta línea celular derivada en 1977 de un carcinoma cervical epidermoide secreta gonadotropina coriónica humana y posee múltiples copias del VPH16 [43], el subtipo de VPH más frecuentemente asociado con el cáncer cervicouterino [55]. En particular, en esta línea celular, se han detectado alrededor de 600 copias del genoma del VPH16 junto con algunas secuencias del VPH18; por ello, las células CaSki expresan altos niveles de los oncogenes E6 y E7 del VPH16. Las células CaSki son únicas entre las líneas celulares establecidas de cáncer cervicouterino porque expresan a E5, un oncogen no expresado por las células SiHa que también posee secuencias del VPH16 [56]. Todas estas propiedades hacen a las células CaSki un excelente modelo para estudiar aspectos del cáncer cervicouterino dependiente de VPH, sobre todo de las formas avanzadas de la enfermedad.

En este trabajo derivamos 5 sublíneas de células CaSki transfectantes estables: cuatro de ellas que sobreexpresan cada uno de los cuatro receptores PTGER y una de ellas portadora del plásmido vacío. Estas sublíneas fueron derivadas para estudiar el papel de cada receptor PTGER en la proliferación de las células CaSki. Los datos de qPCR y de western blot presentados validan la sobreexpresión de cada receptor en cada transfectante estable. Las mediciones de AMPc mostraron que las células CaSki parentales y CaSki PCMV3 tratadas con PGE₂ incrementaron significativamente la producción de este segundo mensajero de igual manera a lo ocurrido con las células CaSki PTGER2 y CaSki PTGER4, lo cual indica la activación funcional de receptores PTGER2/PTGER4. Cabe destacar que no pudimos detectar la inhibición de la producción de AMPc en las células CaSki PTGER3 tratadas con la PGE₂, probablemente porque hizo falta utilizar un estímulo que produjera AMPc y sobre el cual actuara el receptor PTGER3. Un estímulo para ello podría ser la toxina del cólera o la forskolina, agentes que incrementan la producción de AMPc independientemente de la activación de receptores acoplados a proteínas G α s [53].

Los resultados también mostraron que las células CaSki parentales y las distintas transfectantes estables derivadas de ellas crecen de manera dependiente de la concentración

celular en respuesta a los factores de crecimiento y diversas moléculas presentes en el suero fetal bovino e inclusive en presencia de suero fetal bovino tratado con carbón dextrán, una condición restrictiva de moléculas mitogénicas del suero (ciertos factores de crecimiento, esteroides, hormonas y citocinas). Tanto en las células CaSki parentales como en las diferentes células transfectantes estables que sobreexpresan cada uno de los receptores PTGER, se notó un claro efecto supresor de la PGE₂ al efecto promotor de la proliferación dado por el suero.

Una de las metas principales de esta tesis fue evaluar el efecto de la PGE₂ sobre la proliferación de las células CaSki. De manera interesante, observamos que la proliferación de esta línea celular es inhibida significativamente por concentraciones subnanomolares de PGE₂ con una CI₅₀ de 5.74×10^{-9} M. Los valores reportados de Kd para los receptores PTGER para la PGE₂ son 21, 40, 3 y 11 nM, para los receptores PTGER1, PTGER2, PTGER3 y PTGER4, respectivamente [57], lo cual sugiere que este efecto probablemente es mediado principalmente por los receptores PTGER3 y PTGER4. Nuestros datos de expresión apoyan lo anterior ya que observamos que tanto a nivel de RNAm como de proteína, el receptor más abundante en las células CaSki fue PTGER3 seguido por PTGER4, PTGER1 y en último término PTGER2. Estudios previos han concluido que el receptor PTGER4 se expresa en las células CaSki y su expresión se incrementa por el oncogen E5 del VPH16 [39]. Entre las líneas celulares establecidas de cáncer cervical, se ha descrito que las células CaSki expresan bajos niveles del receptor PTGER3 en comparación con las células HeLa, SiHa y C33A [33]. Hasta la fecha no existen estudios que hayan investigado la expresión del receptor PTGER1 en las células CaSki; en cambio, se ha reportado que el receptor PTGER2 no se expresa en estas células [58]; sin embargo, nuestros resultados mostraron que el receptor PTGER2 si se expresa en las células CaSki aunque en niveles muy bajos.

En la literatura existen reportes en células humanas donde la PGE₂ tuvo efectos antiproliferativos, de manera similar a lo que ocurrió en nuestro trabajo. En un estudio realizado en células mononucleares no activadas de sangre periférica se encontró que la PGE₂ a concentraciones mayores a 3 nM inhibe significativamente la proliferación celular; sin embargo, este efecto inhibitorio de la PGE₂ no se observa si las células son previamente activadas con anticuerpos anti CD3, indicando que la PGE₂ interfiere con la activación de las

células [59]. En ese estudio se demostró que la PGE₂ inhibe la expresión de la interleucina-2 y de su receptor, bloqueando de esta manera los pasos iniciales de la activación temprana de las células T [59]. En células de vellosidades coriónicas humanas de primer semestre, la PGE₂ se produce localmente y en concentraciones micromolares inhibe la proliferación celular a través de los receptores PTGER2 y PTGER4, previniendo de esta forma la proliferación y la migración excesiva de los trofoblastos placentarios [60]. De manera interesante, la generación de AMPc mediado por la activación de los receptores PTGER2 y PTGER4 por la PGE₂ parece ser importante en el efecto antiproliferativo de la PGE₂ en el trofoblasto, ya que la combinación de PGE₂ con forskolina, un activador directo de la adenilato ciclasa, acentúa el efecto antiproliferativo [60]. Esto es relevante fisiológicamente, ya que el bloqueo de la proliferación del trofoblasto mononucleado y su diferenciación funcional a sinciotrofoblasto multinucleado es un proceso que se acompaña de la producción endógena de AMPc [61]. De acuerdo con lo anterior, la PGE₂, a concentraciones nanomolares, inhibe la proliferación de las células troncales progenitoras de los tendones humanos e induce la diferenciación aberrante hacia células diferentes de tenocitos; sin embargo, a menores concentraciones la PGE₂ promueve la proliferación de estas células [62]. En células del músculo liso de las vías aéreas de personas asmáticas, las cuales proliferan más que sus contrapartes normales, se encontró que la PGE₂ a altas concentraciones (10 a 100 nM) inhibe significativamente la proliferación celular debido a que esas células son más sensibles a la PGE₂ por expresar mayor número de receptores PTGER2 en su superficie [63]. Otros dos reportes utilizando células no humanas también han descrito efectos antiproliferativos de la PGE₂. En esplenocitos de ratón se encontró que la PGE₂ tiene un efecto dual sobre la proliferación celular inducida por concanavalina A: a elevadas concentraciones (1×10^{-8} M) y a bajas concentraciones (1×10^{-12} M), la PGE₂ inhibe significativamente la proliferación celular, mientras que a concentraciones de 1×10^{-9} M no tiene efecto [64]. Estos resultados probablemente tienen repercusión en la regulación de la función celular inmune. En un reporte realizado en células mononucleares de sangre periférica bovinas se encontró que la exposición crónica (pero no de corta duración) a altas concentraciones de PGE₂ (1×10^{-5} M- 1×10^{-6} M) provocó apoptosis significativa e inhibición de la proliferación celular mediante la activación del receptor PTGER4 [65]. En conjunto, todas las evidencias presentadas dan soporte a que efectivamente la PGE₂ inhibe la proliferación celular de las células CaSki.

En términos generales y de manera opuesta a los resultados aquí presentados, la PGE₂ al activar sus 4 receptores promueve la proliferación celular y la progresión tumoral a través de los mecanismos generales esquematizados en las Figuras 9 y 10. En muestras de cáncer cervical se ha encontrado una elevada producción de PGE₂ y de la COX2 [34, 36, 66], e inclusive COX2 se induce desde las fases tempranas de la enfermedad, lo cual indica que la alta expresión de esta enzima correlaciona con la progresión tumoral y la sobrevivencia de pacientes con cáncer cervicouterino [67, 68]. También se ha descrito que la enzima mPGES-1 se encuentra elevada en lesiones premalignas del cérvix respecto al tejido control, que COX1 se acopla funcionalmente con esta enzima para incrementar la síntesis de PGE₂ [69, 70] y que la mPGES-1 es inhibida por el dimetilcelecoxib [71], lo cual abre un potencial terapéutico de este derivado del celecoxib en el cáncer cervicouterino. Respecto a los receptores PTGER, se ha sugerido que los receptores PTGER2 y PTGER4 activados por la PGE₂ participan en la carcinogénesis cervical a través de mecanismos dependientes de la activación de la PKA [34, 36]. El receptor PTGER4 se encuentra altamente expresado en tejido de cáncer cervical respecto al tejido normal, en parte debido al efecto promotor del oncogen E5 del VPH16 que favorece el reclutamiento de la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB) en el promotor del gen PTGER4 [39]. El receptor PTGER4 incrementa la proliferación y la angiogénesis de células de cáncer cervical HeLa y SiHa mediante la estimulación de la vía de señalización mediada por el receptor del factor de crecimiento epidérmico [72]. En cuanto al receptor PTGER3 se destaca que posee múltiples isoformas, lo cual explica sus respuestas biológicas divergentes ante un mismo estímulo [73]. Sin embargo, parece ser que la sobrevivencia de las pacientes con cáncer cervicouterino disminuye conforme incrementa la expresión de PTGER3, probablemente como consecuencia del incremento en la metástasis [32, 33]. Con respecto al receptor PTGER1, el único reporte existente en el cáncer cervicouterino es que su transcrito se incrementa por el plasma seminal en las células HeLa, sin embargo, se desconoce la relevancia de tal observación [36].

En nuestro estudio también observamos que la proliferación de las células CaSki es incrementada significativamente por el β -estradiol. Estos resultados concuerdan con un reporte que indica que el β -estradiol es un inductor de la proliferación de líneas celulares de cáncer cervical que poseen secuencias del VPH como las células HeLa, SiHa y CaSki pero

que no tiene efecto en células cervicales VPH-negativas como las C33A [54]. A este respecto, tanto el VPH como el β -estradiol incrementan la expresión del canal de potasio EAG1 en células de cáncer cervical [42]. Algunos factores de crecimiento también incrementan la expresión del canal EAG1 como por ejemplo el factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I [74]. Por otro lado, se han descrito algunas moléculas capaces de inhibir la actividad del canal EAG1 como por ejemplo el antihistamínico astemizol y el antidepresivo imipramina [75]. La forma hormonal activa de la vitamina D₃, el calcitriol, tiene efectos antitumorales significativos, entre los cuales se encuentra la supresión transcripcional del canal EAG1 [45, 76]. Los datos del presente estudio muestran que las células CaSki tratadas durante largo tiempo con PGE₂ (48 h) presentan inhibición significativa de la expresión del canal EAG1 respecto al vehículo, algo que no se observa durante el tratamiento de menor duración de 24 h. Estos resultados pueden deberse a que la PGE₂ interfiere con la actividad del promotor EAG1, ya que observamos que la actividad del plásmido reportero que contiene el promotor proximal del gen EAG1 se inhibe significativamente por la PGE₂ a las 48 h de tratamiento. Es probable que la región promotora del gen EAG1 contenga secuencias genómicas que expliquen la regulación negativa observada por la PGE₂, lo cual merece ser estudiado en el futuro. Los tiempos relativamente largos (48 h) en los cuales ocurrió el efecto represor de la PGE₂ sobre el promotor EAG1 sugieren que probablemente el efecto es indirecto y requiere la síntesis de algunos factores celulares para llevarse a cabo.

Resulta interesante que los efectos represivos de la PGE₂ sobre la expresión del canal EAG1 y de la proliferación en las células CaSki parecen ser exclusivos de las células CaSki, ya que en las células SiHa y en las células C33A, la PGE₂ tiene efectos promotores de la proliferación y de la expresión del canal EAG1 (datos no publicados). Recientemente, nuestro laboratorio describió en células CaSki que la xantona α -mangostina derivada del pericarpio de la fruta del mangostán, inhibe la proliferación celular a través de mecanismos dependientes de la inhibición de la expresión del oncogen EAG1 y de los oncogenes E6 y E7 del VPH16 [77]. Estos resultados junto con los presentados en nuestro estudio, indican que las células CaSki son células muy sensibles a factores externos, tal vez debido a que expresan una gran cantidad de oncogenes del VPH que provocan demasiadas alteraciones celulares que las hacen vulnerables a diversas moléculas. Un escenario de este tipo podría observarse en tumores cervicales avanzados, donde las células neoplásicas están tan alteradas que

podrían ser beneficiadas con el tratamiento con PGE₂, un factor que generalmente es promotor tumoral. Esta idea no es tan ilógica, ya que existen reportes del beneficio terapéutico del β-estradiol en ciertos casos raros de cáncer de mama metastásico, una neoplasia generalmente asociada al efecto oncogénico del β-estradiol [78].

Tomando como base que: a) los receptores PTGER2 y PTGER4 se expresan en las células CaSki, b) que se incrementó el AMPc por el tratamiento con PGE₂ en las células CaSki parentales y en las transfectantes estables CaSki PTGER2 y CaSki PTGER4, c) que las células transfectantes estables más sensibles al efecto antiproliferativo de la PGE₂ fueron las células CaSki PTGER2 y CaSki PTGER4, d) que en las células CaSki PTGER2 y CaSki PTGER4 se inhibió la expresión del gen EAG1 y e) que en estas dos últimas sublíneas CaSki se inhibió significativamente la actividad del promotor del canal EAG1 por la PGE₂, consideramos que los efectos inhibitorios de la PGE₂ sobre las células CaSki se deben principalmente a la activación de los receptores PTGER2 y PTGER4. En un estudio realizado con análogos del AMPc se describió inhibición significativa de la proliferación de líneas celulares de cáncer medular de la tiroides [79]. Este efecto antiproliferativo requirió la activación de la PKA y se acompañó de activación de la apoptosis [79]. En la hipófisis, la activación de vías dependientes de AMPc incrementa la proliferación celular de los somatotropos mientras suprime la síntesis de DNA, el ciclo celular y la tasa de proliferación en células de otras estirpes celulares a través de la activación de la PKA y de proteínas de intercambio directamente activadas por AMPc [80]. Estos estudios sugieren que probablemente los efectos antiproliferativos de la PGE₂ en las células CaSki puedan ser mediados por la PKA, lo cual será evaluado en el futuro. De manera importante, nuestros resultados dan soporte al uso de la PGE₂ o algunos derivados para ser evaluados en estudios clínicos de cáncer cervicouterino avanzado.

Conclusiones

La PGE₂ en concentraciones submicromolares, inhibió la proliferación de las células CaSki principalmente a través de los receptores PTGER2 y PTGER4 que están acoplados a la generación de AMPc como segundo mensajero.

La PGE₂, principalmente a través de los receptores PTGER2 y PTGER4, suprimió la expresión génica del canal de potasio oncogénico EAG1 a través de un mecanismo inhibitorio sobre el promotor proximal del gen.

Referencias

1. Duesberg P and Li R (2003) Multistep carcinogenesis: a chain reaction of aneuploidizations. *Cell Cycle* 2:202-10.
2. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS and Jemal A (2023) Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin* 73:17-48. doi: 10.3322/caac.21763
3. Stein CJ and Colditz GA (2004) Modifiable risk factors for cancer. *Br J Cancer* 90:299-303. doi: 10.1038/sj.bjc.6601509
4. Singh GK, Azuine RE and Siahpush M (2012) Global Inequalities in Cervical Cancer Incidence and Mortality are Linked to Deprivation, Low Socioeconomic Status, and Human Development. *Int J MCH AIDS* 1:17-30. doi: 10.21106/ijma.12
5. Burd EM (2003) Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 16:1-17. doi: 10.1128/CMR.16.1.1-17.2003
6. Moreno V, Bosch FX, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, Herrero R, Franceschi S and International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study G (2002) Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 359:1085-92. doi: 10.1016/S0140-6736(02)08150-3
7. Mishra GA, Pimple SA and Shastri SS (2011) An overview of prevention and early detection of cervical cancers. *Indian J Med Paediatr Oncol* 32:125-32. doi: 10.4103/0971-5851.92808
8. Johnson CA, James D, Marzan A and Armaos M (2019) Cervical Cancer: An Overview of Pathophysiology and Management. *Semin Oncol Nurs* 35:166-174. doi: 10.1016/j.soncn.2019.02.003
9. Garcia-Quiroz J, Vazquez-Almazan B, Garcia-Becerra R, Diaz L and Avila E (2022) The Interaction of Human Papillomavirus Infection and Prostaglandin E2 Signaling in Carcinogenesis: A Focus on Cervical Cancer Therapeutics. *Cells* 11. doi: 10.3390/cells11162528
10. Narumiya S, Sugimoto Y and Ushikubi F (1999) Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 79:1193-226. doi: 10.1152/physrev.1999.79.4.1193
11. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D and Phipps RP (2002) Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 23:144-50. doi: 10.1016/s1471-4906(01)02154-8
12. Nakanishi M and Rosenberg DW (2013) Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer. *Semin Immunopathol* 35:123-37. doi: 10.1007/s00281-012-0342-8
13. Park JY, Pillinger MH and Abramson SB (2006) Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin Immunol* 119:229-40. doi: 10.1016/j.clim.2006.01.016
14. Na HK, Park JM, Lee HG, Lee HN, Myung SJ and Surh YJ (2011) 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase as a novel molecular target for cancer chemoprevention and therapy. *Biochem Pharmacol* 82:1352-60. doi: 10.1016/j.bcp.2011.08.005
15. Markovic T, Jakopin Z, Dolenc MS and Mlinaric-Rascan I (2017) Structural features of subtype-selective EP receptor modulators. *Drug Discov Today* 22:57-71. doi: 10.1016/j.drudis.2016.08.003

16. Woodward DF, Jones RL and Narumiya S (2011) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: classification of prostanoid receptors, updating 15 years of progress. *Pharmacol Rev* 63:471-538. doi: 10.1124/pr.110.003517
17. Stock JL, Shinjo K, Burkhardt J, Roach M, Taniguchi K, Ishikawa T, Kim HS, Flannery PJ, Coffman TM, McNeish JD and Audoly LP (2001) The prostaglandin E2 EP1 receptor mediates pain perception and regulates blood pressure. *J Clin Invest* 107:325-31. doi: 10.1172/JCI6749
18. Sun X and Li Q (2018) Prostaglandin EP2 receptor: Novel therapeutic target for human cancers (Review). *Int J Mol Med* 42:1203-1214. doi: 10.3892/ijmm.2018.3744
19. Fabre JE, Nguyen M, Athirakul K, Coggins K, McNeish JD, Austin S, Parise LK, FitzGerald GA, Coffman TM and Koller BH (2001) Activation of the murine EP3 receptor for PGE2 inhibits cAMP production and promotes platelet aggregation. *J Clin Invest* 107:603-10. doi: 10.1172/JCI10881
20. Hatae N, Sugimoto Y and Ichikawa A (2002) Prostaglandin receptors: advances in the study of EP3 receptor signaling. *J Biochem* 131:781-4. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003165
21. Yokoyama U, Iwatsubo K, Umemura M, Fujita T and Ishikawa Y (2013) The prostanoid EP4 receptor and its signaling pathway. *Pharmacol Rev* 65:1010-52. doi: 10.1124/pr.112.007195
22. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C and Mantovani A (2009) Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30:1073-81. doi: 10.1093/carcin/bgp127
23. O'Callaghan G and Houston A (2015) Prostaglandin E2 and the EP receptors in malignancy: possible therapeutic targets? *Br J Pharmacol* 172:5239-50. doi: 10.1111/bph.13331
24. Wang D and Dubois RN (2010) Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer* 10:181-93. doi: 10.1038/nrc2809
25. Alfonso L, Ai G, Spitale RC and Bhat GJ (2014) Molecular targets of aspirin and cancer prevention. *Br J Cancer* 111:61-7. doi: 10.1038/bjc.2014.271
26. Watanabe K, Kawamori T, Nakatsugi S, Ohta T, Ohuchida S, Yamamoto H, Maruyama T, Kondo K, Ushikubi F, Narumiya S, Sugimura T and Wakabayashi K (1999) Role of the prostaglandin E receptor subtype EP1 in colon carcinogenesis. *Cancer Res* 59:5093-6.
27. Bai X, Wang J, Guo Y, Pan J, Yang Q, Zhang M, Li H, Zhang L, Ma J, Shi F, Shu W, Wang Y and Leng J (2014) Prostaglandin E2 stimulates beta1-integrin expression in hepatocellular carcinoma through the EP1 receptor/PKC/NF-kappaB pathway. *Sci Rep* 4:6538. doi: 10.1038/srep06538
28. Ma X, Kundu N, Ioffe OB, Goloubeva O, Konger R, Baquet C, Gimotty P, Reader J and Fulton AM (2010) Prostaglandin E receptor EP1 suppresses breast cancer metastasis and is linked to survival differences and cancer disparities. *Mol Cancer Res* 8:1310-8. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0003
29. Sonoshita M, Takaku K, Sasaki N, Sugimoto Y, Ushikubi F, Narumiya S, Oshima M and Taketo MM (2001) Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in Apc(Delta 716) knockout mice. *Nat Med* 7:1048-51. doi: 10.1038/nm0901-1048
30. Huang HF, Shu P, Murphy TF, Aisner S, Fitzhugh VA and Jordan ML (2013) Significance of divergent expression of prostaglandin EP4 and EP3 receptors in human prostate cancer. *Mol Cancer Res* 11:427-39. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0464

31. Ching MM, Reader J and Fulton AM (2020) Eicosanoids in Cancer: Prostaglandin E2 Receptor 4 in Cancer Therapeutics and Immunotherapy. *Front Pharmacol* 11:819. doi: 10.3389/fphar.2020.00819
32. Heidegger H, Dietlmeier S, Ye Y, Kuhn C, Vattai A, Aberl C, Jeschke U, Mahner S and Kost B (2017) The Prostaglandin EP3 Receptor Is an Independent Negative Prognostic Factor for Cervical Cancer Patients. *Int J Mol Sci* 18. doi: 10.3390/ijms18071571
33. Ye Y, Peng L, Vattai A, Deuster E, Kuhn C, Dannecker C, Mahner S, Jeschke U, von Schonfeldt V and Heidegger HH (2020) Prostaglandin E2 receptor 3 (EP3) signaling promotes migration of cervical cancer via urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR). *J Cancer Res Clin Oncol* 146:2189-2203. doi: 10.1007/s00432-020-03272-0
34. Sales KJ, Katz AA, Davis M, Hinz S, Soeters RP, Hofmeyr MD, Millar RP and Jabbour HN (2001) Cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E(2) synthesis are up-regulated in carcinomas of the cervix: a possible autocrine/paracrine regulation of neoplastic cell function via EP2/EP4 receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 86:2243-9. doi: 10.1210/jcem.86.5.7442
35. Sales KJ, Katz AA, Howard B, Soeters RP, Millar RP and Jabbour HN (2002) Cyclooxygenase-1 is up-regulated in cervical carcinomas: autocrine/paracrine regulation of cyclooxygenase-2, prostaglandin e receptors, and angiogenic factors by cyclooxygenase-1. *Cancer Res* 62:424-32.
36. Sales KJ, Katz AA, Millar RP and Jabbour HN (2002) Seminal plasma activates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 receptor expression and signalling in cervical adenocarcinoma cells. *Mol Hum Reprod* 8:1065-70. doi: 10.1093/molehr/8.12.1065
37. Schmoeckel E, Fraungruber P, Kuhn C, Jeschke U, Mahner S, Kolben TM, Kolben T, Vilsmaier T, Hester A and Heidegger HH (2020) The role of EP-2 receptor expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Histochem Cell Biol* 154:655-662. doi: 10.1007/s00418-020-01909-2
38. Dietlmeier S, Ye Y, Kuhn C, Vattai A, Vilsmaier T, Schroder L, Kost BP, Gallwas J, Jeschke U, Mahner S and Heidegger HH (2020) The prostaglandin receptor EP2 determines prognosis in EP3-negative and galectin-3-high cervical cancer cases. *Sci Rep* 10:1154. doi: 10.1038/s41598-020-58095-3
39. Oh JM, Kim SH, Lee YI, Seo M, Kim SY, Song YS, Kim WH and Juhnn YS (2009) Human papillomavirus E5 protein induces expression of the EP4 subtype of prostaglandin E2 receptor in cyclic AMP response element-dependent pathways in cervical cancer cells. *Carcinogenesis* 30:141-9. doi: 10.1093/carcin/bgn236
40. Noble LS, Takayama K, Zeitoun KM, Putman JM, Johns DA, Hinshelwood MM, Agarwal VR, Zhao Y, Carr BR and Bulun SE (1997) Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 82:600-6. doi: 10.1210/jcem.82.2.3783
41. Chung SH, Wiedmeyer K, Shai A, Korach KS and Lambert PF (2008) Requirement for estrogen receptor alpha in a mouse model for human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cancer Res* 68:9928-34. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2051
42. Diaz L, Ceja-Ochoa I, Restrepo-Angulo I, Larrea F, Avila-Chavez E, Garcia-Becerra R, Borja-Cacho E, Barrera D, Ahumada E, Gariglio P, Alvarez-Rios E, Ocadiz-Delgado R, Garcia-Villa E, Hernandez-Gallegos E, Camacho-Arroyo I, Morales A, Ordaz-Rosado D, Garcia-Latorre E, Escamilla J, Sanchez-Pena LC, Saqui-Salces M, Gamboa-Dominguez A, Vera E, Uribe-Ramirez M, Murbartian J, Ortiz CS, Rivera-Guevara C, De Vizcaya-Ruiz A and Camacho J (2009) Estrogens and human papilloma

virus oncogenes regulate human ether-a-go-go-1 potassium channel expression. *Cancer Res* 69:3300-7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2036

43. Pattillo RA, Husa RO, Story MT, Ruckert AC, Shalaby MR and Mattingly RF (1977) Tumor antigen and human chorionic gonadotropin in CaSki cells: a new epidermoid cervical cancer cell line. *Science* 196:1456-8. doi: 10.1126/science.867042

44. Pardo LA, del Camino D, Sanchez A, Alves F, Bruggemann A, Beckh S and Stuhmer W (1999) Oncogenic potential of EAG K(+) channels. *EMBO J* 18:5540-7. doi: 10.1093/emboj/18.20.5540

45. Avila E, Garcia-Becerra R, Rodriguez-Rasgado JA, Diaz L, Ordaz-Rosado D, Zugel U, Steinmeyer A, Barrera D, Halhali A, Larrea F and Camacho J (2010) Calcitriol down-regulates human ether a go-go 1 potassium channel expression in cervical cancer cells. *Anticancer Res* 30:2667-72.

46. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D and Boyd MR (1988) Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 48:4827-33.

47. Chomczynski P and Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-9. doi: 10.1006/abio.1987.9999

48. Stahlberg A, Hakansson J, Xian X, Semb H and Kubista M (2004) Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clin Chem* 50:509-15. doi: 10.1373/clinchem.2003.026161

49. Deepak S, Kottapalli K, Rakwal R, Oros G, Rangappa K, Iwahashi H, Masuo Y and Agrawal G (2007) Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Curr Genomics* 8:234-51. doi: 10.2174/138920207781386960

50. Burnette WN (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112:195-203. doi: 10.1016/0003-2697(81)90281-5

51. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ and Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7

52. Pradelles P, Grassi J, Chabardes D and Guiso N (1989) Enzyme immunoassays of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate using acetylcholinesterase. *Anal Chem* 61:447-53. doi: 10.1021/ac00180a014

53. Avila E, Diaz L, Barrera D, Halhali A, Mendez I, Gonzalez L, Zuegel U, Steinmeyer A and Larrea F (2007) Regulation of Vitamin D hydroxylases gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and cyclic AMP in cultured human syncytiotrophoblasts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103:90-6. doi: 10.1016/j.jsbmb.2006.07.010

54. Singh M and Singh N (2011) Curcumin counteracts the proliferative effect of estradiol and induces apoptosis in cervical cancer cells. *Mol Cell Biochem* 347:1-11. doi: 10.1007/s11010-010-0606-3

55. Okunade KS (2020) Human papillomavirus and cervical cancer. *J Obstet Gynaecol* 40:602-608. doi: 10.1080/01443615.2019.1634030

56. Sahab Z, Sudarshan SR, Liu X, Zhang Y, Kirilyuk A, Kamonjoh CM, Simic V, Dai Y, Byers SW, Doorbar J, Suprynowicz FA and Schlegel R (2012) Quantitative measurement of human

papillomavirus type 16 e5 oncoprotein levels in epithelial cell lines by mass spectrometry. *J Virol* 86:9465-73. doi: 10.1128/JVI.01032-12

57. Ushikubi F, Hirata M and Narumiya S (1995) Molecular biology of prostanoid receptors; an overview. *J Lipid Mediat Cell Signal* 12:343-59. doi: 10.1016/0929-7855(95)00022-i

58. Kuroda H, Mabuchi S, Yokoi E, Komura N, Kozasa K, Matsumoto Y, Kawano M, Takahashi R, Sasano T, Shimura K, Kodama M, Hashimoto K, Sawada K, Morii E and Kimura T (2018) Prostaglandin E2 produced by myeloid-derived suppressive cells induces cancer stem cells in uterine cervical cancer. *Oncotarget* 9:36317-36330. doi: 10.18632/oncotarget.26347

59. Vercaemmen C and Ceuppens JL (1987) Prostaglandin E2 inhibits human T-cell proliferation after crosslinking of the CD3-Ti complex by directly affecting T cells at an early step of the activation process. *Cell Immunol* 104:24-36. doi: 10.1016/0008-8749(87)90003-7

60. Biondi C, Ferretti ME, Pavan B, Lunghi L, Gravina B, Nicoloso MS, Vesce F and Baldassarre G (2006) Prostaglandin E2 inhibits proliferation and migration of HTR-8/SVneo cells, a human trophoblast-derived cell line. *Placenta* 27:592-601. doi: 10.1016/j.placenta.2005.07.009

61. Avila E, Diaz L, Halhali A and Larrea F (2004) Regulation of 25-hydroxyvitamin D3 1 α -hydroxylase, 1,25-dihydroxyvitamin D3 24-hydroxylase and vitamin D receptor gene expression by 8-bromo cyclic AMP in cultured human syncytiotrophoblast cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90:115-9. doi: 10.1016/j.jsbmb.2004.03.090

62. Zhang J and Wang JH (2014) Prostaglandin E2 (PGE2) exerts biphasic effects on human tendon stem cells. *PLoS One* 9:e87706. doi: 10.1371/journal.pone.0087706

63. Burgess JK, Ge Q, Boustany S, Black JL and Johnson PR (2004) Increased sensitivity of asthmatic airway smooth muscle cells to prostaglandin E2 might be mediated by increased numbers of E-prostanoid receptors. *J Allergy Clin Immunol* 113:876-81. doi: 10.1016/j.jaci.2004.02.029

64. Sergeeva MG, Gonchar MV, Mevkh AT and Varfolomeyev SD (1997) Prostaglandin E2 biphasic control of lymphocyte proliferation: inhibition by picomolar concentrations. *FEBS Lett* 418:235-8. doi: 10.1016/s0014-5793(97)01388-4

65. Maslanka T, Chrostowska M, Otrrocka-Domagala I, Snarska A, Mikiewicz M, Zuska-Prot M, Jasiocka A, Ziolkowski H, Markiewicz W and Jaroszewski JJ (2016) Prostaglandin E2 exerts the proapoptotic and antiproliferative effects on bovine NK cells. *Res Vet Sci* 107:80-87. doi: 10.1016/j.rvsc.2016.05.009

66. Kim YB, Kim GE, Pyo HR, Cho NH, Keum KC, Lee CG, Seong J, Suh CO and Park TK (2004) Differential cyclooxygenase-2 expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 60:822-9. doi: 10.1016/j.ijrobp.2004.04.030

67. Kim HS, Kim T, Kim MK, Suh DH, Chung HH and Song YS (2013) Cyclooxygenase-1 and -2: molecular targets for cervical neoplasia. *J Cancer Prev* 18:123-34. doi: 10.15430/jcp.2013.18.2.123

68. Huang M, Chen Q, Xiao J, Liu C and Zhao X (2013) Prognostic significance of cyclooxygenase-2 in cervical cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer* 132:363-73. doi: 10.1002/ijc.27686

69. Herfs M, Herman L, Hubert P, Minner F, Arafa M, Roncarati P, Henrotin Y, Boniver J and Delvenne P (2009) High expression of PGE2 enzymatic pathways in cervical (pre)neoplastic lesions and functional consequences for antigen-presenting cells. *Cancer Immunol Immunother* 58:603-14. doi: 10.1007/s00262-008-0584-4

70. Radilova H, Libra A, Holasova S, Safarova M, Viskova A, Kunc F and Buncek M (2009) COX-1 is coupled with mPGES-1 and ABCC4 in human cervix cancer cells. *Mol Cell Biochem* 330:131-40. doi: 10.1007/s11010-009-0126-1
71. Deckmann K, Rorsch F, Steri R, Schubert-Zsilavec M, Geisslinger G and Grosch S (2010) Dimethylcelecoxib inhibits mPGES-1 promoter activity by influencing EGR1 and NF-kappaB. *Biochem Pharmacol* 80:1365-72. doi: 10.1016/j.bcp.2010.07.032
72. Parida S, Pal I, Parekh A, Thakur B, Bharti R, Das S and Mandal M (2016) GW627368X inhibits proliferation and induces apoptosis in cervical cancer by interfering with EP4/EGFR interactive signaling. *Cell Death Dis* 7:e2154. doi: 10.1038/cddis.2016.61
73. An S, Yang J, So SW, Zeng L and Goetzl EJ (1994) Isoforms of the EP3 subtype of human prostaglandin E2 receptor transduce both intracellular calcium and cAMP signals. *Biochemistry* 33:14496-502. doi: 10.1021/bi00252a016
74. Ouadid-Ahidouch H and Ahidouch A (2013) K(+) channels and cell cycle progression in tumor cells. *Front Physiol* 4:220. doi: 10.3389/fphys.2013.00220
75. Garcia-Ferreiro RE, Kerschensteiner D, Major F, Monje F, Stuhmer W and Pardo LA (2004) Mechanism of block of hEag1 K+ channels by imipramine and astemizole. *J Gen Physiol* 124:301-17. doi: 10.1085/jgp.200409041
76. Cazares-Ordonez V, Gonzalez-Duarte RJ, Diaz L, Ishizawa M, Uno S, Ortiz V, Ordonez-Sanchez ML, Makishima M, Larrea F and Avila E (2015) A cis-acting element in the promoter of human ether a go-go 1 potassium channel gene mediates repression by calcitriol in human cervical cancer cells. *Biochem Cell Biol* 93:94-101. doi: 10.1139/bcb-2014-0073
77. Diaz L, Bernadez-Vallejo SV, Vargas-Castro R, Avila E, Gomez-Ceja KA, Garcia-Becerra R, Segovia-Mendoza M, Prado-Garcia H, Lara-Sotelo G, Camacho J, Larrea F and Garcia-Quiroz J (2023) The Phytochemical alpha-Mangostin Inhibits Cervical Cancer Cell Proliferation and Tumor Growth by Downregulating E6/E7-HPV Oncogenes and KCNH1 Gene Expression. *Int J Mol Sci* 24. doi: 10.3390/ijms24033055
78. Kota K, Brufsky A, Oesterreich S and Lee A (2017) Estradiol as a Targeted, Late-Line Therapy in Metastatic Breast Cancer with Estrogen Receptor Amplification. *Cureus* 9:e1434. doi: 10.7759/cureus.1434
79. Dicitore A, Grassi ES, Caraglia M, Borghi MO, Gaudenzi G, Hofland LJ, Persani L and Vitale G (2016) The cAMP analogs have potent anti-proliferative effects on medullary thyroid cancer cell lines. *Endocrine* 51:101-12. doi: 10.1007/s12020-015-0597-7
80. Vitali E, Peverelli E, Giardino E, Locatelli M, Lasio GB, Beck-Peccoz P, Spada A, Lania AG and Mantovani G (2014) Cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate (cAMP) exerts proliferative and anti-proliferative effects in pituitary cells of different types by activating both cAMP-dependent protein kinase A (PKA) and exchange proteins directly activated by cAMP (Epac). *Mol Cell Endocrinol* 383:193-202. doi: 10.1016/j.mce.2013.12.006