



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR NUCLEÓTIDOS Y NUCLEÓSIDOS
EN LA MODULACIÓN DE LA MIGRACIÓN CELULAR Y LA
TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA EN CÉLULAS DE CÁNCER
OVÁRICO**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

M. EN C. ANGÉLICA SOFÍA MARTÍNEZ RAMÍREZ

TUTOR: DR. FRANCISCO GABRIEL VÁZQUEZ CUEVAS

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

JURIQUILLA, QUERÉTARO, SEPTIEMBRE DE 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Los miembros del Jurado de Examen de Grado certificamos que la tesis elaborada por: Angélica Sofía Martínez Ramírez, cuyo título es –Señalización mediada por nucleótidos y nucleósidos en la modulación de la migración celular y la transición epitelio mesénquima en células de cáncer ovárico”, se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Doctora en Ciencias Biomédicas y cumple con los requisitos de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente:

Firma

Dra. Carmen Yolanda Aceves Velasco

Secretario (Tutor):

Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas

Vocal:

Dra. Marcela Lizano Soberón

Vocal:

Dra. María del Carmen Méndez Herrera

Vocal:

Dr. Carlos Barajas López

Este trabajo se realizó en el Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas. El proyecto fue apoyado por CONACyT (número 166725 para FG V-C), y PAPIIT-DGAPA-UNAM, México (número IN205114 para FG V-C). Angélica Sofía Martínez Ramírez es alumna del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, y recibió apoyo de CONACyT (número de becario 369701). Este trabajo fue presentado en las siguientes publicaciones:

- **Congreso Internacional 5th Join of the Italian-German Purine Meeting:**
Purinergic signaling contributes to the high state of AKT phosphorylation in ovarian cancer cells. Martínez-Ramírez AS, Vázquez-Cuevas FG, Garay E, Arellano RO.
Abstracts of the fourth joint german-italian purine club meeting 2011. 2012. Purinergic Signal. Mar; 8(1):107-75. doi: 10.1007/s11302-011-9257-4.
- **Congreso Internacional Joint Advanced School 2016 “Receptors and Signaling”:**
EMT and migration in ovarian carcinoma cells are regulated by UTP and adenosine. Martínez-Ramírez AS, Díaz-Muñoz M and Vázquez-Cuevas FG.
- **Congresos Nacionales:**
Martínez-Ramírez AS, Vázquez Cuevas FG, Garay E, Arellano RO, 2014, UTP induces migration and EMT in ovarian cancer cells, Abstract, Memorias del XXX Congreso Nacional de Bioquímica.
- **Artículos de publicación:**

Martínez-Ramírez AS, Garay E, García-Carrancá A, Vázquez-Cuevas FG. 2015, The P2RY2 Receptor Induces Carcinoma Cell Migration and EMT Through Cross-Talk With Epidermal Growth Factor Receptor. J Cell Biochem. Oct 7. doi: 10.1002/jcb.25390.

Martínez-Ramírez AS, Vázquez-Cuevas FG. 2015, Purinergic signaling in the ovary. Mol Reprod Dev. 82 (11):839-48. doi: 10.1002/mrd.22537.Epub 2015 Aug 20. Review.

Resumen

En el contexto de la señalización purinérgica evaluamos el efecto del UTP y la adenosina en células humanas derivadas de carcinoma ovárico (SKOV-3) para estudiar la participación de los receptores P2Y y P1 en los procesos de migración y la transición epitelio mesénquima.

Los resultados mostraron que UTP induce un incremento significativo en la migración con respecto al cultivo control. Por otro lado la incubación con la ectonucleotidasa apirasa reduce la migración hasta en un 50% con respecto a la basal. El bloqueo de la expresión del receptor P2RY2 inhibe el efecto de UTP sobre la migración celular, por lo que se sugiere la participación de este receptor en la respuesta de migración observada. Esta respuesta involucra la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR), que se sugiere por diferentes evidencias farmacológicas y está relacionado con la actividad de las vías de señalización de ERK y AKT.

También se encontró que la reducción en la migración tras la incubación con apirasa es debida al efecto de la adenosina extracelular actuando sobre sus receptores ADORA porque el efecto inhibitor de la migración puede ser bloqueado utilizando diferentes fármacos y enzimas que participan en la señalización mediada por este nucleósido, y además porque la incubación con adenosina produce el mismo efecto que apirasa en la migración.

Con respecto a la inducción de EMT, la incubación con UTP induce un incremento en la expresión del marcador mesenquimal vimentina y una disminución de la expresión de E-caderina, mientras que la incubación con apirasa y con adenosina mantiene la expresión de E-caderina y de B-catenina en las uniones celulares sugiriendo que se favorece el fenotipo epitelial.

Summary

In the context of the purinergic signaling we evaluated the effect of UTP and adenosine in human ovarian carcinoma derived cells, SKOV-3 cells, in order to study the effects of P2Y and P1 receptors in migration and epithelial to mesenchymal transition.

The results showed first that UTP induced a significant effect increasing migration with respect to basal conditions (150%). On the other hand incubation with an ectonucleotidase apyrase reduces basal migration until 50% respect of the basal level. The blockade of P2RY2 expression inhibited the increase in UTP-induced effect on migration, suggesting the participation of this receptor in the migration response. This response involves the epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation, it was suggested for several pharmacological evidences and involves the activation of ERK and AKT pathways.

Also it was seen that the effect of reducing migration by incubation with apyrase is due to the effect of adenosine acting on ADORA receptors, because the inhibitory effect on cell migration can be blocked by using different drugs and enzymes that have a role in adenosine-mediated signaling, and additionally adenosine has the same effect reducing cell migration as apyrase

Regarding EMT induction, incubation with UTP induces an increment in vimentin expression and a decrease E-cadherin expression, while incubation with apirase and adenosine mantains E-cadherin and B-catenin expression in the tight junctions suggesting that favors the epithelial phenotype.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Becaria No. 369701), así como a la dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (cuenta No. 099210674) por el apoyo económico otorgado en la realización de este proyecto.

Al Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas por su tutoría y apoyo en la realización de este proyecto y durante mi estancia en el doctorado, por todos sus consejos, enseñanzas y amistad.

A la Dra. Edith Garay Rojas por la gran ayuda que recibí de su parte en el desarrollo del presente proyecto, además de su apoyo personal y académico.

Al Dr. Rogelio Arellano Ostoia por permitirme pertenecer durante años a su grupo de trabajo y por el apoyo recibido de su parte.

Al Dr. Mauricio Díaz Muñoz por el gran y valioso apoyo brindado en su laboratorio para completar el presente trabajo, así como a la Dra. Olivia Vázquez Martínez.

A los Doctores Alejandro García Carrancá y Alexander Henning Ulrich por permitirme realizar estancias en sus laboratorios para el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Marina Macías Silva y al Dr. Jesús Adolfo García Sáinz, miembros del comité tutor por los valiosos comentarios realizados a lo largo de las evaluaciones durante el doctorado, además de la revisión del artículo de publicación.

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

A los compañeros y amigos de los laboratorios D-13 y B-11.

Agradezco también el apoyo técnico de la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos por su ayuda con las imágenes de microscopía; a la M. en C. Leonor Casanova Rico por su valiosa ayuda en los trámites administrativos, a la Dra. Dorothy Pless por su ayuda en la edición de los textos en inglés, y al Diseñador Gráfico Edwin Ramírez Mendieta.

Índice

Índice.....	VI
Introducción.....	1
Cáncer de ovario	1
Transición epitelio mesénquima y migración en el cáncer.....	5
Señalización purinérgica.....	8
Señalización purinérgica en cáncer	15
<i>El papel de los receptores P2RY en el cáncer.....</i>	16
Importancia de la ectonucleotidasas y sus productos en el cáncer	17
Evidencias de que la comunicación medida por nucleótidos regula la EMT	19
Antecedentes	20
Justificación.....	22
Hipótesis.....	23
Objetivos	24
Objetivo general.....	24
Objetivos específicos	24
Metodología.....	25
Materiales	25
Ensayo de migración	25
Reverso transcripción y reacción en cadena de la polimerasa	25
Marcaje por inmunofluorescencia	27
Silenciamiento de P2RY2	27

Western blot.....	27
Inmunoprecipitación.....	28
Ensayo de viabilidad celular	28
Ensayo de cuantificación de ATP extracelular	29
Resultados	30
UTP induce un incremento en la migración celular.....	30
Las células SKOV-3 expresan a los receptores P2RY2 y P2RY4	31
El receptor P2RY2 es responsable de la migración inducida por UTP	32
La migración inducida por UTP involucra la transactivación del receptor de EGF	34
UTP incrementa la expresión de inductores de EMT.....	38
UTP regula positivamente la expresión de los marcadores de EMT	40
La señalización mediada por receptores ADORA reduce de la migración basal.....	43
Las células de cáncer expresan ectonucleotidasas.....	47
La adenosina induce una reducción en la EMT	49
Las células SKOV-3 expresan al receptor ADORA2B	50
Discusión.....	51
El receptor P2RY2 induce EMT y migración celular	51
La adenosina favorece el fenotipo epitelial y reduce la migración celular	55
Conclusiones.....	60
Referencias	62
Abreviaturas	74
Artículos publicados	76

Introducción

Cáncer de ovario

El cáncer de ovario es la malignidad ginecológica más letal, hasta el 2012 la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC por sus siglas en inglés) reportó una tasa de incidencia para el carcinoma ovárico de 6.8% con respecto al total de la población femenina, y una mortalidad de 4.3%. En México, el cáncer de ovario tiene una tasa de incidencia de 5.6% y una mortalidad de 3.6% (<http://globocan.iarc.fr>). Para el año 2016 el Centro Nacional de Estadísticas de Salud (NCHS por sus siglas en inglés) en Estados Unidos estimó que habrá 22,280 casos nuevos de cáncer de ovario, de los cuales se calcula que habrá 14,240 decesos (63% de pacientes) (Siegel et al., 2016), lo que representa el 63.9% de muertes. Si se comparan estas cifras con el 16.4% de muertes por cáncer de mama y el 31.71% por cáncer cervico-uterino; podemos observar que a pesar de que presentan una frecuencia mayor en la población su mortalidad es menor, lo cual es atribuible al hecho de que se tienen herramientas de prevención y diagnóstico efectivas. Solo el 20% de las pacientes con cáncer de ovario sobreviven después de 10 años del diagnóstico inicial. Aunque este porcentaje de sobrevivencia ha ido incrementando aún representa un reto para la medicina (Narod, 2016).

El cáncer de ovario presenta una mortalidad tan elevada por diferentes razones: la etiología de la enfermedad es poco conocida; es asintomático en las etapas iniciales cuando el tumor está confinado al ovario y los síntomas son poco específicos, el diagnóstico inicial con frecuencia se realiza en etapas avanzadas (70% de los casos) cuando ya existe metástasis diseminada en la cavidad peritoneal (Chan et al., 2006; Siegel et al., 2016; Suh-Burgmann and Powell, 2007).

Entre las herramientas de diagnóstico se encuentran la ultrasonografía transvaginal y la tomografía computarizada abdominal contrastada (TAC). De manera complementaria se busca la presencia de marcadores tumorales como CA125 que es una proteína que prevalece más en células de cáncer incluyendo las de ovario y se usa como marcador en el suero sanguíneo, sin embargo la presencia de este antígeno no es exclusiva para tumores ováricos ya que CA125 puede encontrarse elevado en padecimientos benignos y pueden causar errores

en el diagnóstico. También se emplean otros marcadores como la proteína del epidídimo humana (HE4), CA 19.9 o al antígeno carcinoembrionario (ACE), (Karst and Drapkin, 2010).

La cirugía estadificadora citorreductiva es necesaria para realizar el diagnóstico histológico, para evaluar el grado de diseminación y determinar así la estadificación, además para retirar cuanto sea posible los órganos lesionados. (Prat, 2015).

El cáncer ovárico comprende un grupo heterogéneo de neoplasias que pueden ser derivadas de distintos tipos celulares: 1) de origen no epitelial, que representan el 10%, pueden ser derivados de células germinales, o de células estromales de los cordones sexuales; y 2) derivados de células epiteliales o carcinomas ováricos que son los más comunes (90%) (Naora and Montell, 2005).

Los carcinomas ováricos, se han dividido en cinco subtipos dependiendo de sus características histopatológicas. Los más comunes son el carcinoma seroso de alto grado (70%), carcinoma endometriode (10%), carcinoma de células claras (10%), carcinoma mucinoso (3%) y carcinoma seroso de bajo grado (<5%). Se han clasificado así porque tienen semejanza histológica con otros tejidos del tracto reproductivo: el carcinoma seroso tiene una arquitectura glandular o papilar que asemeja al epitelio superficial papilar de las trompas de Falopio; el carcinoma endometriode se compone de glándulas tipo endometriode; el carcinoma mucinoso tiene semejanza histológica con las áreas de las glándulas endocervicales o del epitelio gastrointestinal; el tipo menos común que es el carcinoma de células claras está asociado con endometriosis pero comparte características morfológicas con los carcinomas seroso y endometriode. (Figura 1) (Cannistra, 2004; Karst and Drapkin, 2010; Kurman and Shih, 2016; van Niekerk et al., 2011; Prat, 2015).

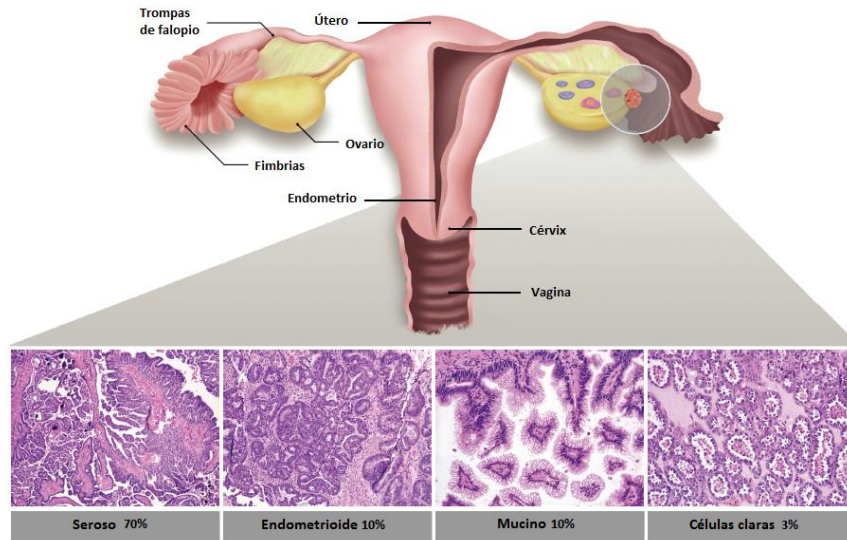


Figura 1.- **Carcinomas ováricos más frecuentes.** Se muestra una representación del tracto reproductor femenino y la tinción de hematoxilina-eosina de cuatro de los subtipos más comunes de carcinomas ováricos: seroso, endometriode, mucino y de células claras (Modificada de Karst and Drapkin 2010).

Una de las hipótesis sugiere que el epitelio ovárico superficial (OSE por sus siglas en inglés) es el tejido en el que se desarrollan los carcinomas ováricos, el OSE tiene un origen mesotelial y se propone que a través del proceso de metaplasia puede cambiar a un epitelio de tipo mülleriano. (Dubeau, 2008; Murdoch and McDonnel, 2002). En el adulto el OSE es una monocapa de células que recubre al ovario completo, se sostiene sobre la corteza ovárica por una membrana basal y las células que lo conforman están unidas por uniones adherentes (tight junctions) y desmosomas (Wong and Leung, 2007).

Se ha observado que el OSE participa activamente en el proceso de ovulación, promoviendo la secreción de proteasas que degradan la túnica albugínea hasta la capa de células de la teca y la pared folicular. Todos estos eventos son inducidos por la hormona luteinizante en cada ciclo ovulatorio, y permiten la apertura del canal por donde es expulsado el ovocito (Colgin and Murdoch, 1997; Murdoch and McDonnel, 2002).

Se ha sugerido que el proceso de constante ruptura y renovación del OSE lleva a la aparición de mutaciones en las células de este epitelio. En los ovarios aparecen estructuras llamadas quistes de inclusión, con mayor frecuencia en los

ovarios de mujeres post-menopáusicas, estos quistes inician como invaginaciones de células epiteliales dentro del estroma ovárico hasta que quedan atrapadas en el interior y se asocian con la aparición de tumores, a esta teoría se le ha llamado la hipótesis de la ovulación incesante (Fleming et al., 2006; Folkins et al., 2009; Murdoch and McDonnel, 2002; Naora and Montell, 2005). En concordancia con esta hipótesis, entre los factores de riesgo se han descrito aquellos en los que la ovulación es un proceso constante, como la nuliparidad y el tratamiento hormonal en las terapias de reproducción asistida; en contraste con el embarazo, la lactancia y el tratamiento con anticonceptivos orales que se han reportado como factores que reducen el riesgo (Cannistra, 2004; Whittemore, 1994).

Con respecto al tipo seroso de alto grado se ha propuesto que son carcinomas intersticiales tubáricos que tienen como origen el epitelio fimbrial de las trompas de Falopio, este es un epitelio que está muy próximo al OSE y está sometido a estímulos hormonales y de factores de crecimiento durante cada ciclo ovulatorio al igual que el OSE, y se sugiere que también puede llevar a la formación de quistes de inclusión por la incorporación de células del epitelio tubárico al estroma ovárico durante la ovulación (Karst and Drapkin, 2010; Kurman and Shih, 2016). Con frecuencia es difícil encontrar lesiones ováricas *in situ*, por lo que aún no existe claridad con respecto al tipo celular del que se originan estos carcinomas (Lengyel, 2010).

Kurman y Shih propusieron una clasificación para los tumores ováricos en dos tipos dependiendo de sus características histopatológicas y sus rasgos genéticos. Los tumores tipo I, se subdividen en tres grupos: el primero corresponde a los tumores relacionados con endometriosis, entre los que se encuentran los carcinomas endometrioides, de células claras y seromucinosos, el segundo son los carcinomas serosos de bajo grado y el tercero corresponde a carcinomas mucinosos y tumores malignos de Brenner; los tumores tipo I generalmente se diagnostican en pacientes jóvenes, provienen de lesiones extraovaricas benignas y se desarrollan en el ovario donde ocurre la transformación maligna, si se quedan confinados al ovario tienen buen pronóstico, no así si ocurre la diseminación peritoneal aunque este segundo escenario ocurre solamente en un 10% de los casos, por lo que normalmente se les considera de bajo grado. Los tumores tipo II ocurren en pacientes post-menopáusicas y están relacionados con la aparición de quistes de inclusión, los carcinomas serosos de alto grado pertenecen a este tipo, se desarrollan como carcinomas intraepiteliales de las trompas de Falopio, normalmente son diagnosticados en etapas avanzadas, a diferencia de los tumores tipo I, porque se diseminan rápidamente a sitios

extraováricos, son altamente agresivos y representan el 90% de las muertes. Se considera que los tumores tipo I tienen una relativa estabilidad genética, aunque presentan mutaciones somáticas en los genes que codifican para PIK3CA, PTEN, β -catenina, KRAS/B-RAF/ERK, y ARID1A. Los carcinomas tipo II presentan inestabilidad cromosomal, se caracterizan por presentar mutaciones en el gen TP53, y también son frecuentes las anomalías en las proteínas retinoblastoma, ciclina E1, FOXM1 y Notch3 (Kurman and Shih, 2016; Lengyel, 2010).

La metástasis a otros órganos peritoneales se presenta por la diseminación de células tumorales suspendidas en el líquido ascítico que se observa con frecuencia en pacientes con carcinomas serosos de alto grado. En ocasiones ocurre invasión de los vasos linfáticos para la diseminación a sitios distantes, la invasión de los vasos sanguíneos es muy rara (Lengyel et al., 2014).

Se han definido cuatro etapas de la enfermedad de acuerdo a la revisión de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO): etapa I, en la que el tumor está confinado al ovario; etapa II, en la que además hay diseminación a las estructuras pélvicas o cáncer peritoneal primario; etapa III, en la que se presenta metástasis en la cavidad peritoneal fuera de la región y/o metástasis a los nódulos linfáticos retroperitoneales; y etapa IV en la que se presenta metástasis a órganos distantes. (Prat, 2015).

El carcinoma ovárico es una patología en la que destaca la baja tasa de supervivencia de las pacientes que la presentan. Los tumores ováricos representan un microambiente complejo, con diferentes interacciones celulares en las distintas etapas de la patología, ya sea en el tumor primario, en la formación de esferoides en líquido peritoneal o en la formación de tumores secundarios. Lo que implica que en esos microambientes, se generan señales a nivel autócrino o parácrino, que tienen un impacto en la forma en la que las células tumorales regulan la proliferación, evasión de la muerte, la diseminación e invasión. Por lo que el entendimiento de los fenómenos celulares y moleculares que pudieran promover la progresión de este tipo de cáncer tiene una gran relevancia y lo convierte en blanco de múltiples estudios.

Transición epitelio mesénquima y migración en el cáncer

Hannahan y Weingberg propusieron en el año 2000 que las células tumorales progresan de un estado normal a uno neoplásico adquiriendo sucesivamente una serie de características que las hacen tumorigénicas. Entre estas características

se encuentran: la promoción de la proliferación, la evasión de la apoptosis, la inducción de angiogénesis, la capacidad de mantener inmortalidad replicativa, la habilidad para evadir supresores del crecimiento y de inducir invasión y metástasis (Hanahan and Weinberg, 2000). Estas características se revisaron años más tarde y se incluyeron otras como la capacidad de evadir la respuesta inmune, la desregulación de la energética celular, la presencia de inestabilidad genética y de mutaciones y la habilidad para inducir inflamación (Hanahan and Weinberg, 2011).

Además Hanahan y Weinberg también proponen que todas las células y moléculas que componen los diferentes microambientes tumorales contribuyen a que las células transformadas lleven a cabo procesos para inducir la invasión; por lo que es claro que las moléculas de señalización a nivel autócrino y parácrino tienen un papel relevante en la inducción de estos procesos (Li et al., 2016).

Las células que tienen un fenotipo epitelial, mantienen una polaridad apico-basal, su acoplamiento lateral se mantiene porque están unidas fuertemente por uniones adherentes (tight junctions) y por uniones comunicantes (gap junctions), se mantienen separadas de otras estructuras por la presencia de una lámina basal y cumplen funciones como mantener una barrera con otros ambientes o de absorción. Por otro lado, las células mesenquimales no mantienen una estructura estrecha entre ellas, *in vitro* son altamente motiles aunque esto no ocurre necesariamente *in vivo*, contactan a sus células vecinas solo focalmente y no están adheridas a la lámina basal, forman parte de los tejidos conectivos adyacentes a los epitelios (Thiery et al., 2009).

En la transición epitelio mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés), las células epiteliales cambian fenotípicamente a través de una serie de procesos que modifican su estructura y actividad, perdiendo la expresión de moléculas que mantienen su acoplamiento y su polaridad y ganando la expresión de proteínas que les permiten migrar y degradar la matriz extracelular para volverse invasivas. Sin embargo no es un proceso absoluto y con frecuencia se pueden encontrar marcadores de ambos fenotipos en células que atraviesan por dicho proceso. La EMT se ha observado en el desarrollo embrionario, en la cicatrización y en la inducción de metástasis (Thiery and Sleeman, 2006a; Thiery et al., 2009). El proceso inverso se conoce como transición mesénquima epitelio (MET, por sus siglas en inglés).

Se ha descrito que diferentes vías de señalización pueden llevar al incremento en la expresión de genes inductores de EMT y por lo tanto llevar a su

activación. Igualmente se ha demostrado que existe comunicación cruzada entre los distintos mecanismos de señalización que regulan la represión de la EMT. Diferentes vías de señalización se han visto implicadas en la inducción de EMT en metástasis, incluyendo aquellas que son activadas por moléculas como factores de crecimiento y citocinas por ejemplo el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento epidermal (EGF), el ligando Wnt, entre otras (Zhang et al., 2015).

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

La activación de estos mecanismos lleva a la expresión de factores de transcripción que son inductores de EMT, se han clasificado en dos grupos dependiendo si tienen efectos directos o indirectos en la represión de la expresión de E-caderina: Snail, Zeb, E47 y KLF8 lo hacen a través de la unión al promotor de E-caderina; mientras que factores de transcripción como Twist, Goosecoid, E2.2 y FoxC2 reprimen la expresión de manera indirecta (Appert-Collin et al., 2015; Thiery and Sleeman, 2006b; Thiery et al., 2009).

Otro de los eventos clave en la adquisición del fenotipo mesenquimal es la inducción de cambios en el arreglo del citoesqueleto y el consecuente incremento en la motilidad. Cuando se activa el programa de EMT se induce la síntesis de nuevas fibras de actina, las cuales unidas a la membrana celular forman lamelipodios, además las células secretan metaloproteasas que degrada la matriz extracelular, facilitando la migración celular (Revisado en Lamouille et al., 2014). También se ha observado la participación de las GTPasas Rho que controlan la motilidad por regular la dinámica de las fibras de actina en respuesta a la actividad de cascadas de señalización como la de PI3K/AKT (Wittmann et al., 2003).

La metástasis es un proceso en el cual las células de un tumor primario invaden sitios distantes a través de los vasos sanguíneos o linfáticos. En este

proceso es indispensable la ruptura de la membrana basal y la matriz extracelular que rodea a las células del tumor, las células que derivan de tejidos epiteliales, normalmente sufren muerte celular conocida como anoikis cuando se desprenden de la membrana basal, por este proceso se evita que estas células sobrevivan fuera de su sitio y mantengan su función. A través de la EMT las células tumorales evaden la muerte celular mientras se vuelven metastásicas. La metástasis es un proceso que involucra los procesos de desprendimiento, migración, invasión y adhesión, los cuales están controlados sucesivamente por la EMT y por su proceso inverso MET por lo que se considera que ambos son procesos transitorios (Guan, 2015).

Los carcinomas ováricos son un grupo heterogéneo de neoplasias en las que se ha visto que las células que forman el tumor con frecuencia expresan no sólo marcadores epiteliales, sino también otros marcadores del fenotipo mesenquimal. Se ha sugerido que las células atraviesan por EMT parcial o que ocurre en diferentes etapas a lo largo de la progresión de la enfermedad. Sin embargo se han encontrado evidencias que muestran que el proceso de EMT induce la adquisición de características tumorales que se relacionan con la agresividad de este tipo de tumores. También se ha relacionado la inducción de EMT con una mayor resistencia a los agentes quimioterapéuticos y a la inducción de características troncales en las células tumorales ovaricas (Ahmed et al., 2007; Davidson, 2001; Pan and Huang, 2008).

Señalización purinérgica

Los nucleótidos y nucleósidos actúan como moléculas de señalización extracelular y su papel ha sido estudiado en los últimos 40 años. Inicialmente se observó que el ATP como neurotransmisor podía ser coliberado con noradrenalina y acetilcolina en las vesículas sinápticas e inducir respuestas en las células de músculo liso del intestino (Burnstock, 1976), a partir de esos estudios pioneros, se ha encontrado que prácticamente todas las células pueden liberar ATP y otros nucleótidos al medio extracelular, y que se unen y activan receptores específicos localizados en la membrana celular que fueron llamados receptores purinérgicos (Burnstock, 2006).

El ATP puede ser liberado por estimulación mecánica o por señales bioquímicas extracelulares; diferentes proteínas membranales participan en este

proceso, por ejemplo canales con dominio de unión a ATP (canales ABC), hemicanales de conexina y panexina, canales maxi-anión, canales aniónicos regulados por volumen e incluso canales activados por ATP como el P2RX7. También se ha mostrado que se liberan grandes cantidades de ATP por secreción granular excitotóxica, lisis celular, y coliberación en vesículas sinápticas con noradrenalina y acetilcolina (Corriden and Insel, 2010).

Una vez en el espacio extracelular los nucleótidos son degradados en pocos segundos a nucleósidos defosforilados por la acción de diferentes ectonucleotidasas presentes en la cara citosólica de la membrana celular. Las ectonucleotidasas pertenecen a cuatro familias de proteínas que presentan diferente actividad. La familia de ecto-nucleósido trifosfato dihidrolasas (ENTPD) o también llamadas CD39, hidrolizan nucleótidos de adenosina tri y di-fosfato y forman AMP, también degradan al trifosfato de uridina (UTP). Las ectonucleótido pirofosfatasas (ENPP) defosforilan diferentes sustratos como ATP, ADP, ADP-ribosa para formar AMP. Las fosfatasas alcalinas (AP) degradan diferentes nucleótidos, liberan fosfato inorgánico (Pi) y producen adenosina por defosforilación secuencial de nucleótidos. Finalmente la ecto 5'-nucleotidasas degrada por hidrólisis estereo-específica a nucleósidos 5' monofosfato y forman adenosina (He et al., 2005; Komoszyński and Wojtczak, 1996; al-Rashida and Iqbal, 2014).

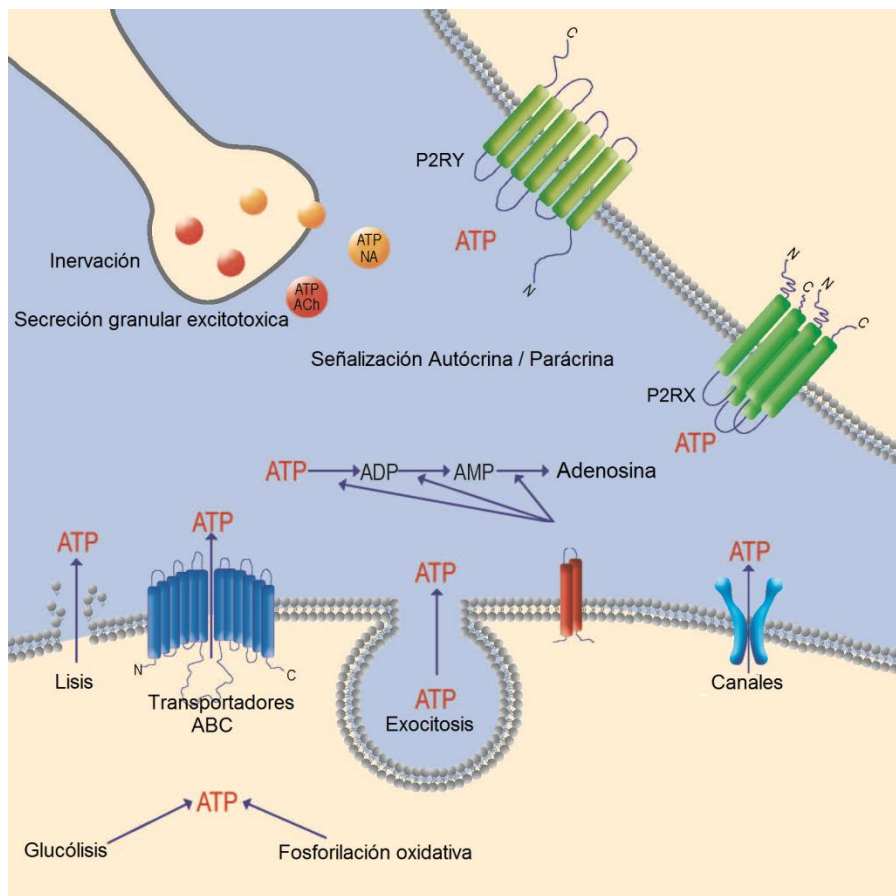


Figura 2.- **Señalización purinérgica.** El ATP y sus metabolitos funcionan como moléculas de señalización a nivel autócrino o parácrino. El ATP puede ser liberado al medio extracelular por señales extracelulares o por estimulación mecánica, a través de diferentes vías como transportadores con dominio de unión a ATP, canales activados por voltaje o mecánicamente, secreción granular excitotóxica, lisis celular o coliberación con noradrenalina y acetilcolina. En el espacio extracelular puede ser degradado por ectonucleotidasas ancladas a la membrana celular a diferentes metabolitos defosforilados. El ATP puede activar receptores P2RX o P2RY (Martínez-Ramírez and Vázquez-Cuevas, 2015).

Los receptores purinérgicos se clasifican en dos grandes familias dependiendo de las moléculas que pueden activarlos extracelularmente: receptores P1 que son sensibles a adenosina, cuya nomenclatura ha sido revisada recientemente denominándolos ADORA (Fredholm et al., 2011), y receptores P2 que responden a ATP y otros nucleótidos (Burnstock, 2006).

La adenosina que es el nucleósido resultante del procesamiento del ATP, puede activar a cuatro diferentes receptores ADORA: ADORA1, ADORA2A,

ADORA2B y ADORA3. Todos son receptores acoplados a proteínas G, de los cuales ADORA1 es preferencialmente acoplado a G_{ai}. ADORA2A y ADORA2B se acoplan a preferencialmente a G_{as} y ADORA3 puede acoplarse a G_{aq} o G_{ai}. Lo que implica, que tras la activación con su agonista los receptores ADORA1 y ADORA3 inhiben a la adenilato ciclasa, disminuyendo los niveles de cAMP, mientras que ADORA2A y ADORA2B incrementan los niveles de éste segundo mensajero. Cada uno de éstos presenta diferencias farmacológicas en respuesta a agonistas y antagonistas sintéticos.

La adenosina puede ser transportada al interior de la célula por la acción de dos familias de transportadores: las proteínas transportadoras equilibradoras (ENT1 y ENT2) y las proteínas transportadoras concentradoras (CNT1 y CNT2) (Fredholm et al., 2011; Sheth et al., 2014).

Receptor	Gen	Tipo de receptor	Agonista fisiológico	Principales efectos en señalización	Referencias
ADORA1	<i>ADORA1</i>	GPCR, acoplado a G _{ai}	Adenosina	↓cAMP, transactivación de TRK's, fosforilación de ERK 1/2 dependiente de PI3K	(Dickenson and Hill, 1998; Schulte and Fredholm, 2000).,
ADORA2A	<i>ADORA2A</i>	GPCR, acoplado a G _{as}	Adenosina	↑cAMP, fosforilación de ERK ½	(Sexl et al., 1997)
ADORA2B	<i>ADORA2B</i>	GPCR, acoplado a G _{as}	Adenosina	↑cAMP; Fosforilación de ERK1/2, JNK y p53	(Feoktistov et al., 1999)
ADORA3	<i>ADORA3</i>	GPCR, acoplado a G _{aq/i}	Adenosina	Activación de la vía PLC/DAG-IP ₃ /Ca ²⁺ , fosforilación de ERK 1/2	(Neary et al., 1998)

Tabla 1.- **Receptores ADORA.** Mecanismos de señalización de los receptores sensibles a adenosina (Modificada de Martínez-Ramírez AS and Vázquez-Cuevas FG, 2015).

Los receptores P2 se clasificaron con respecto a sus características moleculares, bioquímicas y farmacológicas y se subdividieron en dos familias P2RX y P2RY. (Abbraccio and Burnstock, 1994).

Los receptores P2RX son canales catiónicos activados por ligando, se han clonado y caracterizado 7 subunidades (P2RX1-P2RX7). Cada subunidad tiene los siguientes elementos: dos regiones transmembranales (TM1 y TM2), TM1 está implicada en la apertura del canal, mientras que la segunda en la formación el poro; una asa extracelular larga que contiene dominios de cisteína conservados entre las subunidades que les permiten formar puentes disulfuro, también contiene

el sitio de unión al ATP cerca de las regiones transmembranales; los extremos amino y carboxilo terminal se encuentran en el lado intracelular y contienen sitios consenso de fosforilación de proteínas cinasas que modulan su actividad (Erb et al., 2006).

Un receptor P2RX funcional se forma por la unión de tres subunidades iguales o diferentes, formando así homo o heterotrímeros. Se han descrito siete receptores homoméricos (P2RX1, P2RX2, P2RX3, P2RX4, P2RX5, P2RX6, P2RX7) y seis heteroméricos (P2X1/P2X2, P2X1/P2X4, P2X1/P2X5, P2X2/P2X3, P2X2/P2X6, P2X4/P2X6). Estos receptores son canales catiónicos no selectivos que permean Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . Una respuesta típica consiste en un incremento rápido en la corriente entrante de iones en respuesta al agonista o fase de activación; una fase de desensibilización en la que la corriente decae lentamente aún en presencia del agonista; y un decaimiento rápido de la corriente al retirar al agonista o fase de desactivación (Coddou et al., 2011; Samways et al., 2014). Los receptores P2RX son activados en general por ATP, pero se han encontrado diferencias farmacológicas que permiten diferenciar entre los receptores formados por las diferentes subunidades, aunque las respuestas farmacológicas de los heterotrimeros son compartidas y con frecuencia su identificación por farmacología es más compleja (North, 2002).

Los receptores P2RY son receptores de siete pases transmembranales acoplados a proteínas G y se conocen hasta la fecha 8 subtipos: P2RY1, P2RY2, P2RY4, P2RY6, P2RY11, P2RY12, P2RY13 y P2RY14, cada uno presenta diferente preferencia por una proteína G: P2Y1, 2, 4 y 6 se unen a $G_{\alpha q/11}$, P2Y11 se puede unir a $G_{\alpha q/11}$ o a $G_{\alpha s}$ y P2Y12, 13 y 14 se unen a $G_{\alpha i}$. Los receptores P2Y acoplados a $G_{\alpha q}$ promueven la señalización a través de fosfoinosítidos y activan a la PLC, mientras que los acoplados a $G_{\alpha i}$ inhiben a la adenilato ciclasa y modulan una gran cantidad de proteínas efectoras, por ejemplo a los canales rectificadores entrantes de K^+ , así como canales de Na^+ y Ca^{2+} , las MAPKs, y cinasas como la PKC o la PI3K (von Kügelgen, 2006)(Von Kügelgen, 2006).

Receptor	Gen	Tipo de receptor	Agonista	Principales efectos en señalización	Referencias
P2RX1	<i>P2RX1</i>	Canales iónicos activados por ligando. Forma heterotrímeros con P2RX2, P2RX4 o P2RX5	ATP	Influjo de Ca ²⁺ y Na ⁺ y eflujo de K ⁺ . Fosforilación de ERK ½ dependiente de Ca ²⁺	(Oury et al., 2002)
P2RX2	<i>P2RX2</i>	Canales iónicos activados por ligando. Forma heterotrímeros con P2RX1, P2RX4, P2RX3, o P2RX6	ATP	Influjo de Ca ²⁺ y Na ⁺ y eflujo de K ⁺ . Fosforilación de ERK ½ dependiente de Ca ²⁺	(Swanson et al., 1998)
P2RX3	<i>P2RX3</i>	Canales iónicos activados por ligando. Forma heterotrímeros con P2RX2	ATP	Influjo de Ca ²⁺ y Na ⁺ y eflujo de K ⁺ . Despolarización, señalización mediada por CALM	(Lin et al., 1990)
P2RX4	<i>P2RX4</i>	Canales iónicos activados por ligando. Forma heterotrímeros con P2RX1, P2RX2 o P2RX6	ATP	Influjo de Ca ²⁺ y Na ⁺ y eflujo de K ⁺ . Despolarización, señalización mediada por CALM	(Lin et al., 1990)
P2RX5	<i>P2RX5</i>	Canales iónicos activados por ligando. Forma heterotrímeros con P2X1	ATP	Influjo de Ca ²⁺ y Na ⁺ y eflujo de K ⁺ .	(Lin et al., 1990)
P2RX6	<i>P2RX6</i>	Canales iónicos activados por ligando. Forma heterotrímeros con P2X2 o P2RX4	ATP	Influjo de Ca ²⁺ y Na ⁺ y eflujo de K ⁺ . Despolarización, señalización mediada por CALM	(Lin et al., 1990)
P2RX7	<i>P2RX7</i>	Canales iónicos activados por ligando. Solo forma homotrímeros	ATP	Influjo de Ca ²⁺ y Na ⁺ y eflujo de K ⁺ . Activación de PI3K, AKT, Src y PRKC; fosforilación de ERK 1/2 y p38. Liberación de IL-1β y TNF-α.	(Bulanova et al., 2005; Gendron et al., 2003; Panenka et al., 2001)
P2RY1	<i>P2RY1</i>	GPCR, acoplado a G _{αq/11}	ADP	Activación de la vía PLC/DAG-IP ₃ /Ca ²⁺	(Horváth et al., 2014)

P2RY2	<i>P2RY2</i>	GPCR, acoplado a $G_{\alpha q/11}$	UTP=ATP	Activación de la vía PLC/DAG-IP ₃ /Ca ²⁺ , activación de EGFR y PDGFR dependiente de Src e integrinas	(Erb et al., 2006; Nicholas et al., 1996; Soltoff et al., 1998)
P2RY4	<i>P2RY4</i>	GPCR, acoplado a $G_{\alpha q/11}$	UTP=ATP	Activación de la vía PLC/DAG-IP ₃ /Ca ²⁺ . inhibición de canales de Ca ²⁺ tipo N y de K ⁺ tipo M	(Filippov et al., 2003; Nicholas et al., 1996)
P2RY6	<i>P2RY6</i>	GPCR, acoplado a $G_{\alpha q/11}$	UDP	Activación de la vía PLC/DAG-IP ₃ /Ca ²⁺	(Nicholas et al., 1996)
P2RY11	<i>P2RY11</i>	GPCR, acoplado a $G_{\alpha q/11}$ Y $G_{\alpha s}$	ATP	Activación de la vía PLC/DAG-IP ₃ /Ca ²⁺ , ↑cAMP	(White et al., 2003)
P2RY12	<i>P2RY12</i>	GPCR, acoplado a $G_{\alpha i}$	ADP	↓cAMP	(Marteau et al., 2003)
P2RY13	<i>P2RY13</i>	GPCR, acoplado a $G_{\alpha i}$	ADP	↓cAMP	(Waldo and Harden, 2004)
P2RY14	<i>P2RY14</i>	$G_{\alpha i}$	UDP-glucosa, UDP-galactosa	↓cAMP	(Harden et al., 2010)

Tabla 2.- **Receptores P2**, mecanismos de señalización de los receptores P2 sensibles a ATP y otros nucleótidos (Martínez-Ramírez and Vázquez-Cuevas, 2015).

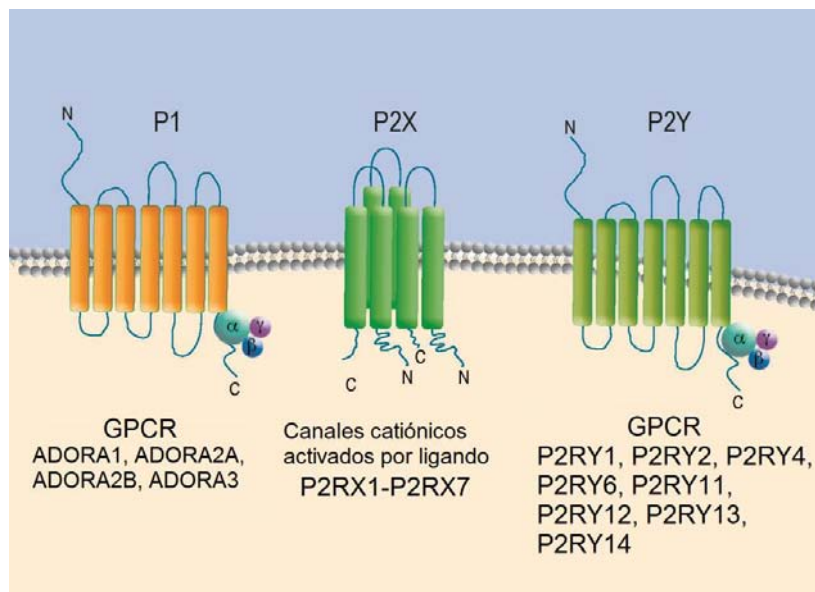


Figura 3.- **Receptores purinérgicos.** Los receptores activados por nucleótidos y nucleósidos se dividen en P1 activados por adenosina y P2 activados preferencialmente por ATP que se subdividen en P2X y P2X.

Se ha demostrado que el UTP también puede ser liberado al espacio extracelular en respuesta a estímulos similares a los que promueven la liberación de ATP, por ejemplo por estimulación mecánica. Además también se sabe que las ectonucleotidasas de las familias ENTPD y ENPP pueden degradar nucleótidos de uridina y llevar a la formación de UDP y fosfato inorgánico (Harden and Lazarowski, 1999; De Ita et al., 2016; Jin et al., 2014a). El UTP es un ligando fisiológico de los receptores P2RY2 y P2RY4, y el UDP del receptor P2RY6 (von Kügelgen, 2006).

Señalización purinérgica en cáncer

El papel pato-fisiológico del ATP se ha estudiado en diferentes modelos de cáncer y se ha descrito un papel en la proliferación de las células tumorales, en el incremento en la angiogénesis, la evasión de la apoptosis, la inducción de EMT y el incremento de la motilidad celular y la invasión, pero dependiendo del modelo estudiado también se ha observado un efecto anti-neoplásico. (Adinolfi et al., 2012; Daniele et al., 2014; Li et al., 2015; Martínez-Ramírez et al., 2016; Vázquez-Cuevas et al., 2013).

Se sabe que en el cáncer ocurre una desregulación metabólica, incluso en condiciones adecuadas de oxígeno, que lleva a la producción de grandes cantidades de ATP y de lactato por glucólisis aerobia. Se ha observado que dicho efecto está asociado a la activación de oncogenes, por desregulación de supresores de tumores o a la actividad del Factor Inducible por Hipoxia (HIF) tanto en condiciones aeróbicas como en microambientes hipóxicos, como resultado se promueve la producción de lactato a partir de piruvato, incrementando la actividad glucolítica, y disminuyendo la actividad mitocondrial (Cairns et al., 2011; Kim and Dang, 2006; Warburg, 1956). Además también se ha demostrado que la concentración de adenosina y de ATP es más elevada en el espacio intersticial tumoral comparado con tejidos sanos (Ohta et al., 2006; Pellegatti et al., 2008). Por lo que es posible afirmar que el ATP está presente en el medio ambiente tumoral.

El receptor P2RX7 ha sido el más estudiado en el contexto del cáncer. Se ha observado sobreexpresión de P2RX7 en tumores epiteliales uterinos, de colon, carcinoma urotelial de riñón, de células claras de riñón, de mama, y de ovario (Adinolfi et al., 2012; Qiu et al., 2014; Vázquez-Cuevas et al., 2014). Se ha propuesto que existe un umbral en la concentración de ATP extracelular que regula por un lado proliferación mientras la concentración se mantiene baja y que dosis más elevadas de éste nucleótido pueden llevar a un efecto citotóxico que promueve la muerte celular por apoptosis (Di Virgilio et al., 2009).

El efecto induciendo proliferación de las células de carcinoma ovárico mediado por el receptor P2RX7 ha sido estudiado recientemente por nuestro grupo de trabajo (Vázquez-Cuevas et al., 2014) y por otros grupos en diferentes modelos de cáncer (Adinolfi et al., 2012). Se considera al receptor P2RX7 como un importante biomarcador de tumores sólidos y como un posible blanco farmacológico que requiere una investigación detallada (Roger et al., 2015).

El papel de los receptores P2RY en el cáncer

Los estudios básicos sobre las acciones fisiológicas de los receptores P2RY2 revelaron que su actividad está relacionada con la inducción de proliferación celular. Los mecanismos activados por este receptor comprenden la activación de la vía PI3K/AKT, a la cinasa Src, y a la cinasa de calcio calmodulina tipo II (Choi et al., 2013).

Se ha descrito que los receptores P2RY2 y P2RY4 se sobreexpresan en el carcinoma de colon en comparación con los tejidos sanos. Además también se encontraron por western blot las bandas correspondientes a las proteínas de los receptores en los tejidos tumorales al igual que en la línea celular de cáncer de colon HT-29. Lo que sugiere que pueden ser marcadores de dicha patología y que pueden tener un rol activo en el desarrollo de la misma (Nylund et al., 2007).

En el carcinoma hepatocelular se ha observado que la activación del receptor P2RY2 induce proliferación y migración celular (Xie et al., 2014). Un efecto similar se ha observado en los modelos de cáncer de próstata, mama y pulmón (Bilbao et al., 2010; Choi et al., 2013; Li et al., 2015; Schafer et al., 2003). Por otra parte, se ha encontrado un efecto del ATP reduciendo el crecimiento de células de carcinoma nasofaríngeo y colorectal involucrando al receptor P2RY2 (Höpfner et al., 2001; Yang et al., 2014). Estas observaciones aparentemente antagónicas pueden implicar diferencias en las acciones de los nucleótidos entre los distintos tipos celulares.

El control de la migración celular es relevante en el contexto del cáncer, debido a que una característica fundamental de la inducción de metástasis es la adquisición de habilidades migratorias por las células tumorales. Así, se ha observado que la activación del receptor P2RY2 puede inducir migración celular en diferentes condiciones fisiológicas como en el epitelio bronquial, el músculo liso vascular y en las células de la piel durante la cicatrización (Eun et al., 2015; Jin et al., 2014b; Morris et al., 2012), así como en diferentes líneas celulares de cáncer como el de mama, de próstata, Schwannoma y carcinoma hepatocelular (Chadet et al., 2014; Lamarca et al., 2014; Li et al., 2015; Xie et al., 2014). También se ha encontrado participación de los receptores P2RY6 en la inducción de migración e inducción de EMT en cáncer de mama (Azimi et al., 2016) y del receptor P2RY1 en el modelo de glioblastoma (Jantaratnotai and McLarnon, 2011).

Importancia de la ectonucleotidasas y sus productos en el cáncer

Diferentes estudios han mostrado la importancia de la actividad de las ectonucleotidasas y de los receptores a adenosina en el cáncer, enfatizando en las interacciones entre las células tumorales y las células del sistema inmune en el microambiente tumoral (Jin et al., 2010). Se ha observado que la presencia de

citosinas en el ambiente tumoral puede regular la expresión de la NT5E en células inmunes como los macrófagos, células CD8+ y células dendríticas, modulando así la concentración de adenosina en el ambiente extracelular tumoral. La regulación de los niveles de adenosina puede conducir a la inhibición de la actividad de las células inmunes en algunos tipos de cáncer (Regateiro et al., 2012).

Específicamente sobre células de cáncer de ovario se ha mostrado que CD39, CD73 y el receptor ADORA2A pueden influenciar negativamente la actividad antitumoral de las células T, lo que ha llevado a proponer que las ectonucleotidasas pueden ser un blanco terapéutico. Se ha sugerido el uso de anticuerpos específicos para CD39 y CD73 usados en conjunto con los agentes quimioterapéuticos para mejorar su actividad (Häusler et al., 2014, 2011).

Además de su papel en la evasión de la respuesta inmune tumoral se ha estudiado también el posible papel de la adenosina en la fisiología de las células tumorales. Se ha reportado la presencia de adenosina como un factor promotor del crecimiento tumoral, mientras el tumor crece rápidamente, comienzan a presentarse microambientes hipóxicos y necróticos. En estos microambientes se ha observado que hay liberación de adenosina y también producción y degradación de esta en el ambiente extracelular por acción del metabolismo enzimático. La presencia de adenosina en el microambiente tumoral puede beneficiar el crecimiento del tumor lo cual puede deberse a protección contra la isquemia, estimulación de la proliferación celular y de la angiogénesis y supresión de la respuesta inmune antitumoral. (Spychala, 2000). En células de glioblastoma la expresión y la actividad de los receptores ADORA1 y ADORA2B correlaciona con la inducción de apoptosis. En concordancia se ha observado que los agonistas de ambos receptores tienen un efecto sinérgico con la inducción de apoptosis con temozolomida (TMZ), el fármaco más usado en la quimioterapia del glioblastoma (Daniele et al., 2014).

Diferentes estudios sobre el papel de la adenosina en cáncer ovárico han generado resultados controversiales. Mientras que algunos estudios reportan un mal pronóstico en pacientes con tumores con elevada expresión de CD73, y por tanto una alta tasa de síntesis de adenosina (Turcotte et al., 2015); otros grupos han encontrado una correlación entre la mayor expresión de CD73 y un mejor pronóstico en pacientes con carcinomas serosos ováricos (Oh et al., 2012). También se ha reportado que adenosina tiene un papel en la inducción de apoptosis y reducción de la proliferación en líneas celulares OVCAR-3 y CAOV-3.

Los estudios farmacológicos realizados sugieren al receptor ADORA2B como el posible receptor involucrado en la respuesta observada (Hajiahmadi et al., 2015a).

Evidencias de que la comunicación medida por nucleótidos regula la EMT

Diferentes estudios revelan un papel modulador del sistema purinérgico sobre la migración celular y la EMT; por ejemplo, en la regulación de la fisiología del epitelio bronquial, en el epitelio corneal o cerebral por mecanismos cuya vía de señalización converge con la activación de receptores a factores de crecimiento con actividad de cinasa de tirosina, como el EGFR (Block et al., 2011; Boucher et al., 2010; Peterson et al., 2010).

Otros estudios demuestran que los receptores P2 participan en el mantenimiento de la homeostasis del calcio intracelular observada en células que atraviesan por el proceso de EMT inducido por EGF o por TGF- β . En este proceso se ha descrito que la movilización de Ca^{2+} mediada por receptores purinérgicos, actúa de manera coordinada con la actividad de transportadores con dominio de unión a ATP (Canales ABC), que pueden liberar a este nucleótido al medio extracelular (Davis et al., 2011; Lohman et al., 2012; Mahdi et al., 2015; Stewart et al., 2015).

Existe evidencia mostrando una relación entre EGF y ATP en la inducción de EMT en diferentes modelos de cáncer. Por ejemplo en células de cáncer de mama la inducción de EMT por condiciones de hipoxia y la actividad de EGF como respuesta incrementó la expresión del receptor P2RY6. El bloqueo de la expresión de este receptor y el uso de fármacos antagonistas para éste llevaron a una reducción en la EMT y en la migración inducidas por hipoxia (Azimi et al., 2016). En células de cáncer de próstata se ha descrito que la estimulación con ATP induce invasión y migración por una vía que implicaba al receptor P2RY2, al receptor de EGF y la actividad de ERK 1/2 y de la IL-8. Cuando se bloquea la expresión del receptor P2RY2 se abole parte de la respuesta de la inducción de invasión y EMT de las células de cáncer de próstata, la parte restante de la respuesta observada se atribuyó a la actividad del receptor P2RX7 (Li et al., 2015; Qiu et al., 2014).

Antecedentes

En estudios previos de nuestro laboratorio analizamos en células derivadas de carcinoma ovárico, la posible participación del receptor P2RX7 en la viabilidad celular. En ese caso, las células derivadas de carcinoma ovárico humanas SKOV-3 y CAOV-3 mostraban una elevada expresión del receptor P2RX7 y su estimulación con BzATP, un agonista para el receptor P2RX7, inducía un incremento en la viabilidad celular y la fosforilación de las MAPK ERK1/2 (Vázquez-Cuevas et al., 2014).

Tratando de evaluar el efecto de diferentes agonistas y antagonistas purinérgicos sobre otra de las características de las células de cáncer que es la inducción de un fenotipo migratorio, se encontró que el ATP y principalmente el UTP podían incrementar la migración celular. Por medio de ensayos de herida observamos un incremento en la migración celular (19.91 ± 1.33 % de invasión del área raspada) en respuesta a UTP, comparada con el cultivo control (12.5 ± 0.89 % de invasión), Además, observamos que la incubación con apirasa inhibía la migración celular (Figura 4).

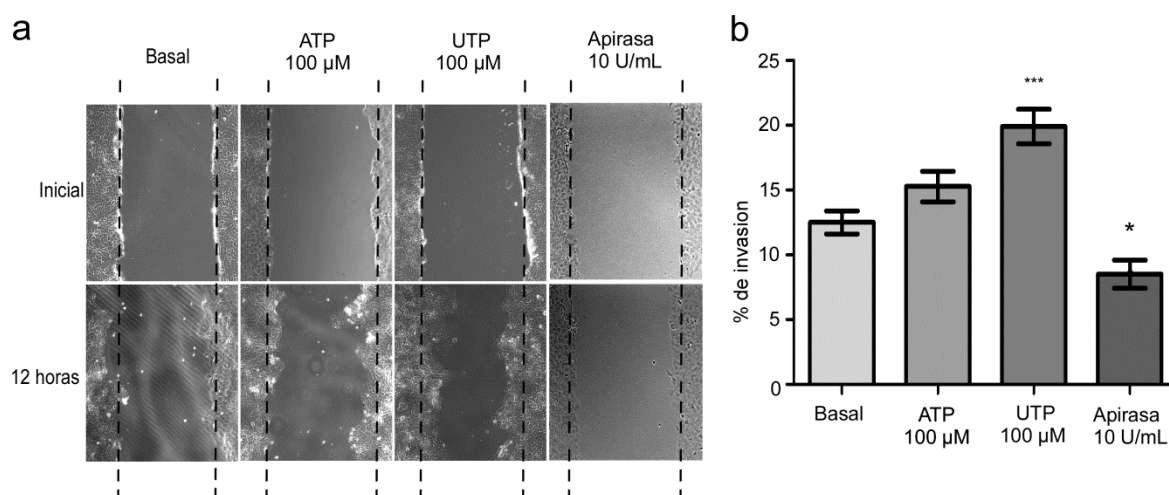


Figura 4.- **ATP y UTP inducen migración en células SKOV-3.** a) Imágenes representativas de la migración inducida por ATP, UTP y apirasa, se muestran las imágenes iniciales y después de 12 horas de incubación con los fármacos, b) cuantificación del porcentaje de invasión del área raspada del cultivo. *** $p < 0.001$ Basal vs UTP, * $p < 0.05$ Basal vs Apirasa.

A partir de estas observaciones se decidió evaluar si la incubación con UTP tenía participación en la modificación del fenotipo de las células SKOV-3, para esto se marcó a los filamentos de actina con faloidina rodaminada y se observó por microscopía confocal las características de las células SKOV-3 incubadas con tres concentraciones diferentes de UTP, 1, 10 y 100 μM . Se observó que la incubación con UTP después de 24 y 48 horas inducía la formación de fibras de estrés en las células en cultivo que no se observaban en los cultivos control, lo que indica la progresión hacia un fenotipo mesenquimal (Figura 5).

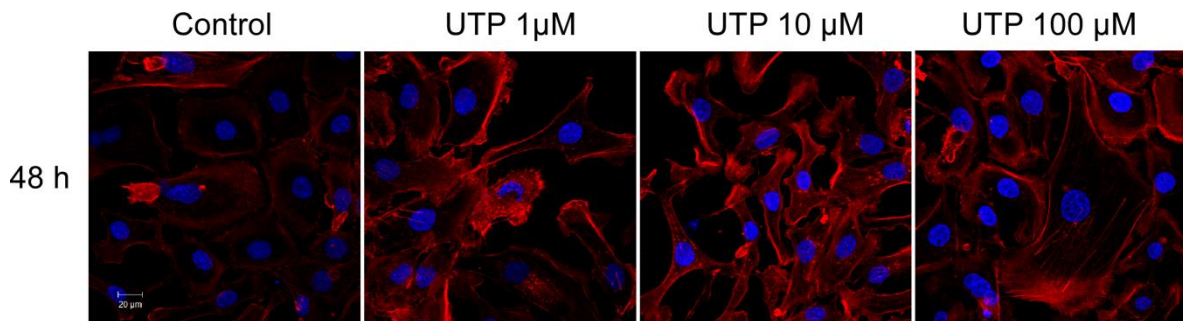


Figura 5.- **La incubación con UTP induce la formación de fibras de estrés en células SKOV-3.** Las células SKOV-3 fueron incubadas con tres concentraciones diferentes de UTP por 48 horas. Se muestra el marcaje de los núcleos con DAPI, en rojo la marca de los filamentos de actina con faloidina rodaminada.

Se decidió entonces estudiar de una forma más detallada la señalización celular inducida por dicho nucleótido en las células SKOV-3 y su posible interacción con la inducción de dos de los procesos inherentes de la inducción de metástasis, que son la EMT y la migración.

Justificación

Las células SKOV-3 derivadas de carcinoma ovárico, expresan diferentes receptores P2 que tienen como ligando común al ATP, a la fecha es poca la información disponible acerca del sistema purinérgico de comunicación celular en modelos de cáncer ovárico. Debido a la variedad de receptores que pueden ser activados por nucleótidos y sus metabolitos defosforilados, la señalización purinérgica es un mecanismo complejo de transmisores que es regulada a nivel autócrino o parácrino.

Los receptores purinérgicos pudieran tener importancia en la patología del cáncer ovárico, regulando la inducción de EMT y por ende la capacidad invasiva de dicha patología.

Hipótesis

La señalización purinérgica modula eventos que participan en la progresión del cáncer como son la transición epitelio mesénquima y la migración en las células de carcinoma ovárico.

Objetivos

Objetivo general

Estudiar la participación de la señalización purinérgica en la inducción de la transición epitelio mesénquima y de la migración en células derivadas de carcinoma ovárico.

Objetivos específicos

1. Evaluar la participación de la señalización purinérgica en la migración de las células SKOV-3.
2. Estudiar el papel de la señalización purinérgica en la inducción de la transición epitelio-mesénquima, evaluando la expresión de marcadores de éste proceso.
3. Determinar el receptor o receptores responsables de las respuestas fisiológicas encontradas.
4. Describir la posible vía de señalización por medio de la cual el receptor purinérgico implicado en la respuesta de EMT y migración lleva a cabo tales procesos.

Metodología

Materiales

Las células SKOV-3, MDA-MB-231 y OVCAR-3 se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC). El medio de cultivo RPMI, el suero fetal bovino y la mezcla de antibiótico-antimicótico (anfotericina B, estreptomycin y penicilina, 1X) y la tripsina fueron usados de Life Technologies (Calrsbad, CA). El antibiótico puromicina fue usado de Santa Cruz Biotechnology, CA). El UTP, EGF, wortmanina y todas las sales se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y el inhibidor AG1478 de TOCRIS Bioscience (Bristol, UK).

Ensayo de migración

Los ensayos de migración se realizaron utilizando placas de 12 pozos y cámaras de Boyden con una membrana con poros de 8 micras (Millipore, Billerica, MA). Un número de 3×10^4 células se sembraron en el lado apical de la cámara y se aplicaron los fármacos indicados. El lado basolateral se llenó con medio RPMI condicionado. Después de 16 horas de incubación las células que quedaron adheridas en la cara basal de la membrana se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS por 10 minutos, se permeabilizaron con metanol y se tiñeron con hematoxilina. Las células de la cara superior de la membrana se limpiaron cuidadosamente con la ayuda de un hisopo. Las muestras se observaron bajo un microscopio de luz, se tomaron fotografías del campo completo y se analizaron utilizando el software Image J (NIH, Bethesda, MD).

Reverso transcripción y reacción en cadena de la polimerasa

La reverso transcripción usando RNA total de las células SKOV-3, MDA-MB-231 y OVCAR-3 se realizó utilizando el kit Reverse Transcription System (Promega, Fitchburg, WI) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción en cadena de la polimerasa en punto final se llevó a cabo para la amplificación de los transcritos de *ACTB*, *GAPDH*, *P2RY2*, *P2RY4*, *SNAIL*, *TWIST*, *ADORA1*, *ADORA2A*, *ADORA2B*, *ADORA3* y en tiempo real para *ENTPD1*, *ENTPD3*, *ENPP1*, *ENPP3*, *ALPL*, *ALPP*, *NT5E* y *TUBB* usando cDNA como cadena templado en ambos casos. Los programas de PCR comenzaron en 95° por 3

minutos y terminaron a 75° por 1 minuto. Los programas de amplificación en punto final consistieron en 30 ciclos a 30 seg a 95°C, 40 seg a la temperatura de alineación específica para cada par de oligonucleótidos, y 45 seg a 75°C, todos los oligonucleótidos fueron de Sigma-Aldrich excepto los de *GAPDH* que fueron de Life Technologies.

Para PCR en tiempo real los programas de amplificación consistieron en 30 seg a 95°C, alineación por 30 seg a 60°C, y 30 seg a 70°C y se usaron los oligonucleótidos de Exxtend (Campinas, SP Brasil).

Las secuencias de oligonucleótidos, las temperaturas de alineación y el número de ciclos fueron de la siguiente forma:

Gen	Forward (5' – 3')	Reverse (5' – 3')	T de alineación	Ciclos
<i>ACTB</i>	GGGTCAGAAGGATTCCTAT G	GGTCTCAAACATGATCTGGG	55°C	25
<i>P2RY2</i>	TCCTGTTTCCCGCAGAGTTC	CACCTGACCAGGGCTTTCAT	58°C	35
<i>P2RY4</i>	CTGCAAGTTCGTCCGCTTTC	CAAAGAACAGGTTGGGCACG	58°C	35
<i>SNAIL</i>	TTCTTCTGCGCTACTGCTGC G	GGGCAGGTATGGAGAGGA	60°C	33
<i>TWIST</i>	GAGTCCGCAGTCTTACGAG G	CTGCCCGTCTGGGAATCACT	60°C	33
<i>ADORA 1</i>	TCCCTCTCCGGTACAAGAT G	GCTGCTTGCGGATTAGGTAG	55°C	35
<i>ADORA 2A</i>	TCTTCAGTCTCCTGGCCATC	TCCAACCTAGCATGGGAGTC	55°C	35
<i>ADORA 2B</i>	TCCATCTTCAGCCTTCTGGC	AAAGGCAAGGACCCAGAGGA	55°C	35
<i>ADORA 3</i>	CAGCAAAGCGTCAACTCGT GC	CAAACGGGAGAAGCAGAGGA AC	55°C	35
<i>GAPDH</i>	CAAGGTCATCCATGACAAC TTG	GTCCACCACCCTGTTGCTGTA G	60°C	35
<i>ENTPD1</i>	AGGTTCTTCCGAAACGGG	CACGTTAGACTCCTTTGTATC TTCC	60°C	35
<i>ENTPD3</i>	TTTCCCTGGACACCTTCAAC	TGTATTTGGGGCCAAGTCTC	60°C	35
<i>ENPP1</i>	TGGGTTGAAACCAAGCTGT GCCA	ACAGGCAGCATCACAGCGAC A	60°C	35
<i>ENPP3</i>	GCAGGTGGACCAGTCAGTG CC	CCGCTGCTTCAGGCCTTCCA	60°C	35
<i>ALPL</i>	CATTGGCACCTGCCTTACTA	GCTCCAGGGCATATTTTCAGT	60°C	35
<i>ALPP</i>	ATCTCCGTGATGAATCGGG C	CATGTTGGAGATGAGCTGCG	60°C	35
<i>NT5E</i>	GAACCTGGCTGCTGTATTG C	ACACCACATGGATTCCGCC	60°C	35
<i>TUBB</i>	TCGTGCACATCCAGGCTGG TC	TAGGTGCCGGTGGGGTCGAT	60°C	35

Marcaje por inmunofluorescencia

El marcaje de P2RY2, P2RY4, Vimentina, E-caderina y SNAIL por inmunofluorescencia se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito previamente (Vázquez-Cuevas et al., 2013); los anticuerpos primarios (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) se usaron en dilución 1:100, y el anticuerpo secundario fue anti-conejo IgG acoplado a Alexafluor488 (Life Technologies) diluido 1:1000. Las muestras se analizaron por microscopía confocal (Zeiss Axiovert 200 LSM Meta- Multiphotonic).

Silenciamiento de P2RY2

El silenciamiento genético se llevó a cabo transfectando por medio de lipofectamina una mezcla de tres vectores lentivirales cada uno codificando shRNAs diseñados específicamente para bloquear la expresión del receptor P2RY2 humano (sc-42579-SH, Santa Cruz Biotechnology), de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante. Las células transfectadas fueron seleccionadas utilizando medio RPMI conteniendo 10% de suero fetal bovino y 3 µg/mL de puomicina. La eficiencia de silenciamiento génico se determinó por RT-PCR y Western blot. Se utilizó un plásmido control que contiene la secuencia de lectura abierta de la proteína verde fluorescente (copGFP) para evaluar la eficiencia de transfección y un plásmido codificante para una secuencia shRNA aleatoria (random shRNA). Clonas derivadas de una sola célula se obtuvieron por dilución de las células transfectadas.

Western blot

Células SKOV-3 se sembraron en placas de 12 pozos con medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibiótico-antimicótico. Los cultivos semiconfluentes se incubaron en medio sin suero por 24 horas previas al tratamiento con el fármaco en cada condición experimental. El análisis de western blot se realizó como se describió previamente (Vázquez-Cuevas et al., 2013). Los anticuerpos primarios contra ERK-fosforilado (P-ERK), ERK total (T-ERK), EGFR fosforilado (P-EGFR), EGFR total (T-EGFR), Vimentina, E-caderina, SNAIL y ACTB (Cell Signaling Technologies) se adicionaron en una dilución 1:1000 y se

incubaron toda la noche a 4°C. El anticuerpo secundario, HRP-conjugado cabra anti-conejo (Life Technologies) se usó a una dilución 1:10,000. Las proteínas inmunoreactivas se detectaron por quimioluminiscencia con el sustrato Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific). Las imágenes se analizaron con el software ImageJ (NIH). Cuando era necesario, las membranas se blanquearon incubándolas con solución de blanqueo (50 mM Tris, pH 6.8, 100 mM β -mercaptoethanol, and 2% SDS) antes de ser incubadas con otro anticuerpo primario.

Inmunoprecipitación

Las células fueron lisadas con TNTE al 0.5% conteniendo: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, y una tableta que contiene una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche, Mannheim, Germany). El lisado celular se centrifugó por 5 minutos a 10,000 rpm a 4°C, la fracción soluble se incubó toda la noche con 3 μ L de anticuerpo anti-SNAIL (Cell Signaling Technologies), y posteriormente se agregaron 50 μ L de proteína G agarosa y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron por 1 minuto a 14,000 rpm a 4°C; las perlas de agarosa se lavaron tres veces con TNTE con 1% de Tritón X-100 e inhibidores de proteasas, y después se prepararon las muestras para electroforesis en gel y analizadas por Western blot.

Ensayo de viabilidad celular

La actividad mitocondrial del cultivo completo se analizó usando el método de reducción de la sal [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2-tetrazolio (ensayo de MTS) utilizando el kit comercial Cell Titer 96 (Promega). Para este ensayo, las células SKOV-3 se cultivaron en placas de 96 pozos en medio RPMI con 10% de SFB; 24 horas después el medio se cambió a medio RPMI libre de suero y se agregó el tratamiento indicado, los cultivos se incubaron por el tiempo indicado en cada caso. El ensayo de MTS se llevó a cabo como se describe en las instrucciones del fabricante. Se midió la absorbancia a 495 nm; los resultados se expresaron como el incremento de absorbancia con respecto a las células control.

Ensayo de cuantificación de ATP extracelular

Las células SKOV-3, OVCAR-3 y MDA-MB-231 se sembraron en una densidad de 3×10^5 en placas de 96 pozos negras con fondo claro. Justo en el momento del ensayo el medio de cultivo se sustituyó por medio de incubación libre de fosfatos inorgánicos (KCl 5 mM, NaCl 120 mM, CaCl_2 2 mM, MgCl_2 2 mM, glucosa 10 mM y buffer Hepes 20 mM). Para el ensayo de cuantificación de ATP se utilizó el Kit Adenosine 5'-triphosphate (ATP) bioluminiscent somatic cell assay (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se agregó la solución de luciferina-luciferasa preparada en el kit y se incubó por 3 y 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación se midió la luminiscencia. La concentración de ATP en el medio extracelular se calculó extrapolando los valores de luminiscencia medidos, con los obtenidos por una curva patrón de ATP desde 200 μM hasta 20 mM.

Resultados

UTP induce un incremento en la migración celular

Previamente habíamos observado un incremento en la capacidad invasiva cuando se incubaba el cultivo de células SKOV-3 con UTP. Mediante el uso de cámaras de Boyden, en este trabajo se incubó por 12 horas con ATP, UTP y UDP (100 μ M) o con apirasa (10 U/mL). Transcurrido el tiempo se contaron las células que atravesaron la membrana de los insertos y se encontró que ATP y UTP inducen un incremento en la migración celular (160.8 ± 22.49 y 152.4 ± 9.03 % del basal respectivamente), siendo estadísticamente significativo para UTP.

También se observó el efecto de reducción en la migración basal cuando se incubó con la ectonucleotidasa apirasa (46.70 ± 3.75 % del basal) (Figura 6a y b). No se encontró diferencia entre los cultivos control y los incubados con UDP.

Para confirmar que el resultado observado era debido a un efecto sobre la migración y no sobre la proliferación celular se evaluó por el método de MTS la viabilidad celular en cultivos de células SKOV-3 que fueron incubadas por 24 horas con tres concentraciones de UTP (1, 10 y 100 μ M). No se observaron diferencias entre las tres concentraciones de UTP y el cultivo control, por lo tanto no se observa un papel para la proliferación en el efecto inducido por UTP y el resultado previo puede ser considerado como un efecto sobre la migración (Figura 6c).

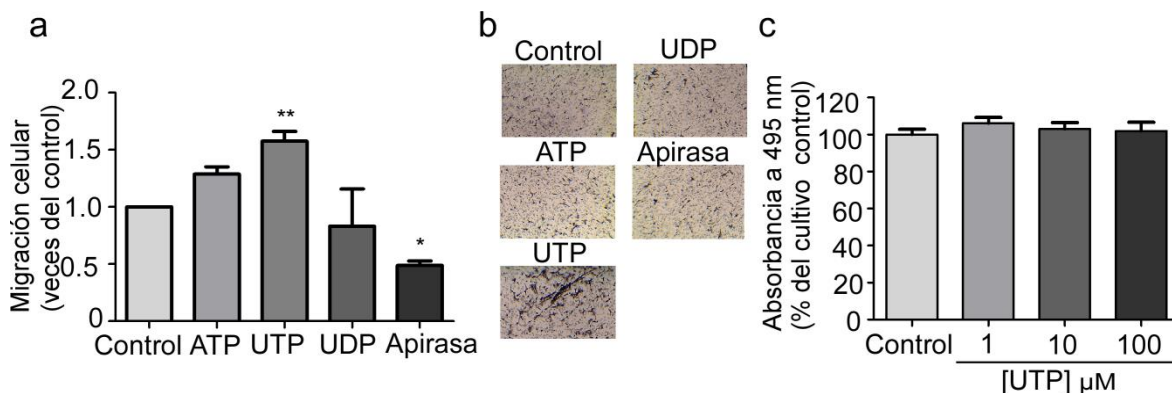


Figura 6.- **La estimulación con UTP induce un incremento en la migración celular.** a) Cuantificación del porcentaje de células que migraron a través de la membrana de la cámara de Boyden, las células se incubaron por 12 horas con ATP, UTP, UDP (100 μ M) o

con apirasa 10 U/mL; b) imágenes representativas de las membranas teñidas con hematoxilina, las células fueron tratadas con los diferentes agonistas a las concentraciones indicadas previamente; c) Cuantificación de la absorbancia a 495 nM después de agregar el reactivo de MTS en cultivos incubados por 24 horas con UTP 1, 10 y 100 μ M. ** $p < 0.01$ Control vs UTP, * $p < 0.05$ Control vs Apirasa.

Las células SKOV-3 expresan a los receptores P2RY2 y P2RY4

Los receptores P2RY2 y P2RY4 tienen como agonista al ATP y son los únicos receptores purinérgicos conocidos que pueden ser activados por UTP. Dado que observamos una respuesta en la inducción de la migración por este nucleótido decidimos evaluar la expresión de ambos receptores en la línea celular SKOV-3. En la figura 7a se muestran los transcritos de amplificación para ambos receptores. Además también se analizó la presencia de la proteína por inmunofluorescencia y microscopía confocal (Figura 7b). Se encontró la presencia de la proteína de los dos receptores presumiblemente en la membrana celular, que se puede apreciar por la localización en la proyección ortogonal (PO). Las células SKOV-3 expresan a los dos posibles receptores blanco para el UTP, sin embargo es difícil distinguirlos farmacológicamente porque presentan una firma muy similar.

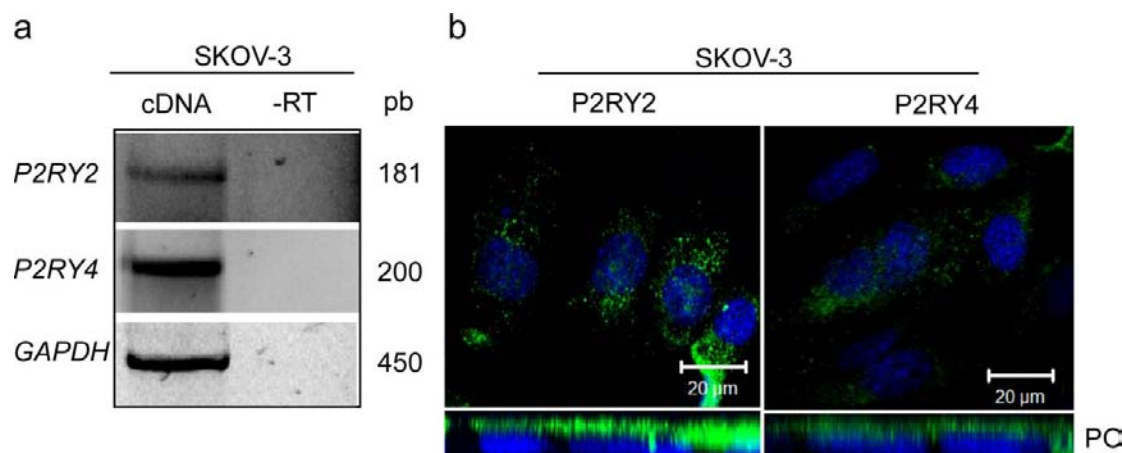


Figura 7.- **Las células SKOV-3 expresan a los receptores P2RY2 y P2RY4.** a) Presencia del transcrito de *P2RY2*, *P2RY4* y GAPDH en geles de agarosa; b) Marcaje por inmunofluorescencia de las proteínas de P2RY2 y P2RY4 (verde), marca de los núcleos con DAPI (azul), en la parte inferior se muestra la proyección ortogonal (PO).

El receptor P2RY2 es responsable de la migración inducida por UTP

Con el fin de analizar si el aumento de la migración inducida por UTP depende de la actividad de un receptor P2RY evaluamos el efecto de la incubación de las células con suramina 100 μ M sobre la migración por el método de herida, adicionada sola o 20 minutos antes de agregar UTP 100 μ M. En esas condiciones se observó que suramina sola no tiene un efecto significativo sobre la migración basal, pero previene el efecto de UTP en la inducción de migración celular (Figura 8).

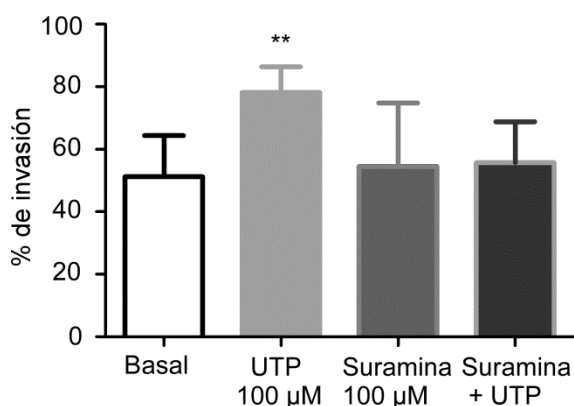


Figura 8.- **Suramina reduce el efecto inductor de migración de UTP.** Cuantificación de la invasión del área dañada en el método de herida. ** $p < 0.01$ Basal vs UTP.

Las evidencias sugirieron fuertemente que el receptor P2RY2 podía ser el receptor responsable de la respuesta observada en la inducción de migración celular. Para confirmar este efecto se decidió inhibir la expresión de este receptor utilizando una mezcla de 3 shRNAs. Utilizando esta estrategia se logró reducir la cantidad del mRNA de P2RY2 consistentemente y el nivel de expresión de la proteína fue indetectable por Western blot. Como controles se analizó la presencia del mRNA de P2RY2 en células intactas y en células que fueron transfectadas en las mismas condiciones con un shRNA aleatorio (Random shRNA). Como transcrito de referencia utilizamos el de la enzima GAPDH. En el caso de la presencia de la proteína se comparó la abundancia relativa de la proteína de P2RY2 con la de β -actina (ACTB) (Figura 9a).

En las células SKOV-3 intactas, las células knock down para el receptor P2RY2 (P2RY2-KD) y las células transfectadas con un shRNA aleatorio (Random-shRNA) se cuantificó la migración celular en condiciones control y en presencia de 100 μ M de UTP. Se observó que las células P2RY2-KD no aumentaban su respuesta migratoria cuando eran estimuladas con UTP. Las células intactas mostraron un incremento significativo en la migración comparado con su control de 171.4 ± 20.71 % del basal, similar al aumento observado en las células Random-shRNA (145.4 ± 14.75 % del basal). Estos resultados muestran que el receptor P2RY2 está directamente relacionado con el aumento en la migración celular en respuesta al estímulo con UTP (Figura 9b).

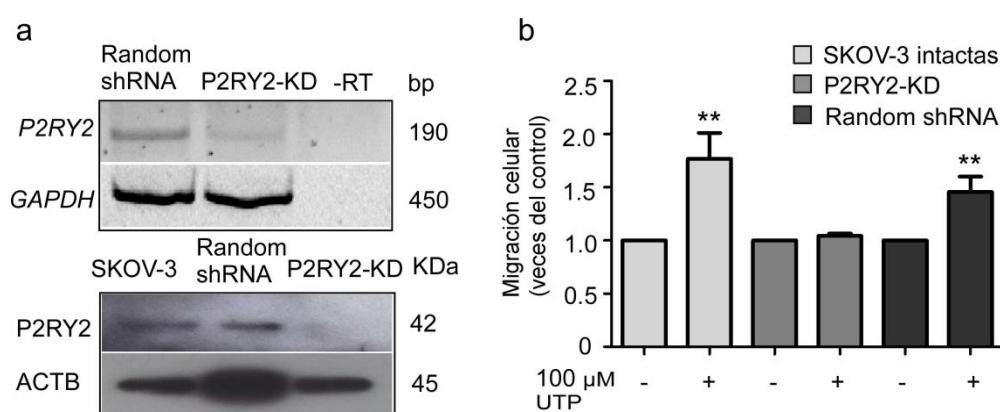


Figura 9.- **El receptor P2RY2 induce migración en las células SKOV-3.** a) Análisis por RT-PCR de la expresión del transcrito de *P2RY2* en células transfectadas con un shRNA aleatorio (Random shRNA), con el shRNA dirigido a P2RY2 (P2RY2-KD) y control negativo (-RT), como transcrito constitutivo se analizó la expresión de *GAPDH*. En el panel inferior se muestra el análisis por Western blot de la expresión de la proteína de P2RY2 en células SKOV-3 intactas, en células Random shRNA y en células P2RY2-KD, como control se comparó contra la expresión de β -actina (ACTB); b) Cuantificación de la migración celular inducida en células control e incubadas con UTP 100 μ M, utilizando células SKOV-3 intactas, Random shRNA y P2RY2-KD. ** $p < 0.01$ Control vs UTP.

La migración inducida por UTP involucra la transactivación del receptor de EGF

Para analizar la participación de la interacción de los receptores P2RY2 y EGFR en la capacidad invasiva utilizamos AG1478 un inhibidor de la actividad de cinasa de tirosina del EGFR, y evaluamos la migración celular en cultivos co-incubados con UTP. La preincubación con AG1478 (1 μ M, 100 nM y 10nM) inhibió el efecto en la migración celular inducido por UTP, siendo significativo para la concentración más alta 1 μ M (76.43 ± 22.67 % del basal) (Figura 10), no se encontraron diferencias significativas en el nivel de migración en ausencia de UTP a concentraciones de AG1478 utilizadas aunque se observó una ligera disminución con la concentración de AG1478 de 1 μ M.

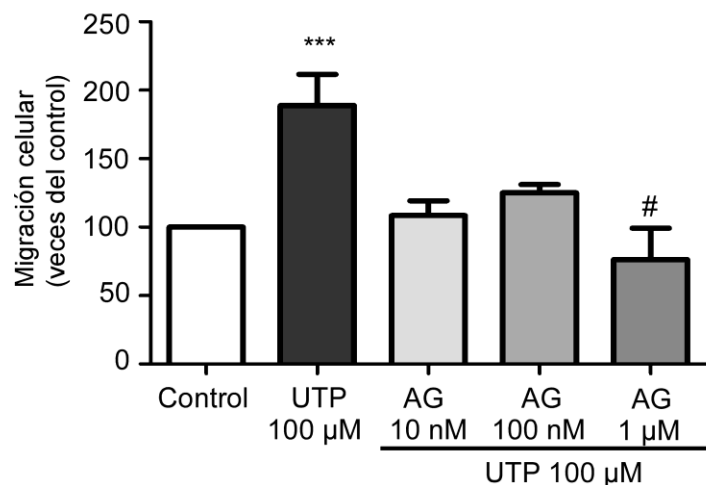


Figura 10.- **La inhibición de la actividad de EGFR reduce la migración inducida por UTP.** Cuantificación de la migración celular inducida por UTP 100 μ M y efecto de la preincubación con el inhibidor de la actividad de cinasa de tirosina AG1478 (10 nM, 100 nM y 1 μ M) en células SKOV-3. *** $p < 0.001$ Control vs UTP y # $p < 0.001$ UTP vs AG1478 1 μ M + UTP.

Para conocer la posible vía de señalización que participa en la transactivación del EGFR, se decidió utilizar wortmanina un inhibidor de la actividad de la PI3K para evaluar si la activación de esta vía de señalización está involucrada en el efecto migratorio observado. Se agregó al cultivo celular wortmanina a tres concentraciones (100, 10 y 1 nM), 20 minutos después se aplicó el estímulo con UTP 100 μ M, se observó que wortmanina es capaz de inhibir el

efecto inducido por UTP en la migración de las células SKOV-3, con un efecto máximo a 100 nM (Figura 11).

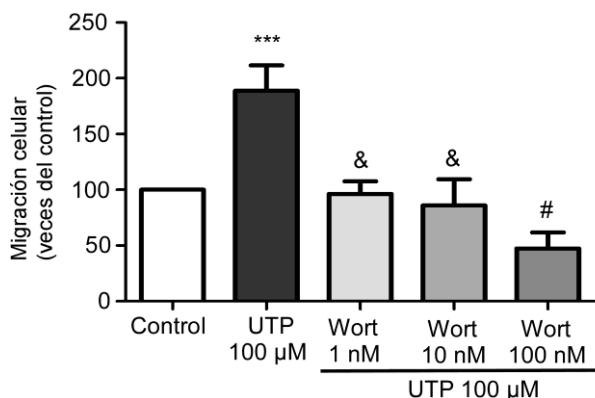


Figura 11.- **La inhibición de la actividad de PI3K reduce la migración inducida por UTP.** Cuantificación de la migración celular inducida por UTP 100 μM y efecto de la preincubación con el inhibidor de PI3K wortmanina (1 nM, 10 nM y 100 nM) en células SKOV-3. *** $p < 0.001$ Control vs UTP, & $p < 0.01$ UTP vs Wort 1nM + UTP y UTP vs Wort 10 nM + UTP, # $p < 0.001$ UTP vs Wortmanina 100 nM + UTP.

Con el fin de estudiar la forma en la que el receptor P2RY2 lleva a la transactivación del EGFR decidimos evaluar el efecto de la preincubación del cultivo con 4-Amino-5-(4-cloropenil)-7-(t-butil)pirazol[3, 4-d]pirimidina (PP2), un inhibidor de la cinasa Src. Utilizando dos concentraciones (1 y 10 μM) se observó que la actividad de la cinasa Src es necesaria para llevar a cabo la inducción de la migración de las células SKOV-3 (Figura 12).

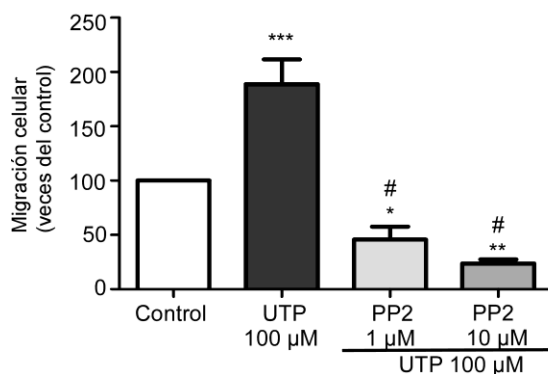


Figura 12.- **La migración celular inducida por UTP depende de la actividad de Src.** Cuantificación de la migración celular inducida por UTP 100 μM y efecto de la preincubación con el inhibidor de la cinasa Src PP2 (1 μM y 10 μM) en células SKOV-3.

*** $p < 0.001$ Control vs UTP, * $p < 0.05$ Control vs PP2 1 μM + UTP, ** $p < 0.01$ Control vs PP2 10 μM + UTP, # $p < 0.001$ UTP vs PP2 1 μM + UTP y UTP vs PP2 10 μM + UTP.

Para corroborar que el EGFR se activa en respuesta a la incubación con UTP 100 μM , se evaluó la presencia de la forma fosforilada del EGFR en el residuo de tirosina 1068 que corresponde a la forma activa del receptor. Se incubó a las células por diferentes tiempos con UTP y se observó que a partir de los 5 minutos de incubación con el nucleótido se incrementa la forma fosforilada de EGFR, siendo significativo a los 60 minutos de incubación tiempo en el cual se presenta un efecto máximo (202.1 ± 36.39 % del basal) (Figura 13a).

Para analizar la actividad de algunos de los elementos activados por el EGFR evaluamos la actividad de las cinasas ERK 1/2. En este caso evaluamos la abundancia de las formas fosforiladas en treonina 202/tirosina 204, con respecto al total de ambas proteínas, en células que fueron incubadas por diferentes tiempos entre 5 minutos y 60 minutos con UTP 100 μM en presencia o ausencia del inhibidor del EGFR, AG1478 100 nM.

Se encontró que la forma fosforilada de ERK aumenta significativamente a partir de los 5 minutos de incubación con UTP (234.8 ± 30.14 % del basal), a los 10 minutos de incubación con el nucleótido la fosforilación de ERK regresa a su nivel basal; a los 30 minutos de incubación se observó un segundo incremento que se mantuvo hasta los 60 minutos analizados (172.5 ± 59.21 % del basal). La preincubación con AG1478 previno la fosforilación de ERK a partir de los 30 minutos, pero no la fosforilación temprana que se presenta en los primeros 5 minutos (Figura 13b). Estos resultados nos indican que la activación de las MAPKs ERK inducida por UTP presenta dos componentes, uno a tiempos cortos que depende solo de la activación de receptores sensibles a UTP y otro en tiempos más prolongados que depende de la transactivación del receptor de EGFR.

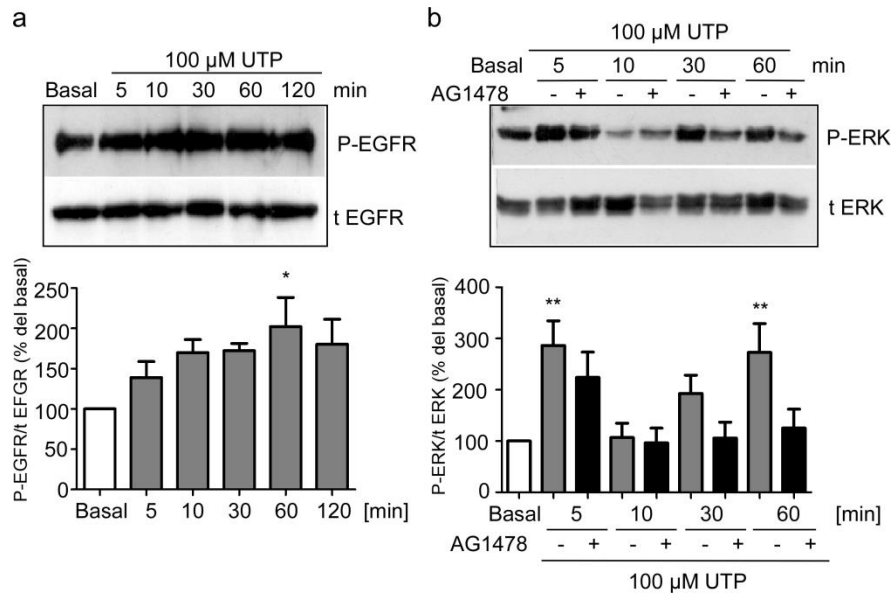


Figura 13.- **La incubación con UTP incrementa la fosforilación de EGFR y ERK.** a) Análisis por Western blot, en el panel superior se observan imágenes representativas de abundancia de EGFR fosforilado (P-EGFR) y EGFR total (t EGFR) en células SKOV-3 incubadas con UTP 100 μ M por diferentes tiempos hasta 120 minutos, panel inferior cuantificación de la densidad óptica de las bandas de tres experimentos independientes; b) Imágenes representativas de abundancia de ERK 1/2 fosforilado (P-ERK) y ERK total (t ERK) en células SKOV-3 incubadas con UTP 100 μ M hasta por 60 minutos y preincubadas con AG1478 100 nM, panel inferior cuantificación de la densidad óptica de las bandas de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$ Basal vs UTP 60 minutos, ** $p < 0.01$ Basal vs UTP 5 minutos y Basal Vs UTP 60 minutos.

En las células P2RY2-KD se evaluó la fosforilación de EGFR en respuesta a la incubación con UTP 100 μ M y no se encontró diferencia significativa en ninguno de los tiempos estudiados (Figura 14a). También, en estas células deficientes en la expresión de P2RY2 resultó abolida la fosforilación de ERK inducida por UTP a los 30 y 60 minutos pero no a los 5 minutos, lo que muestra que a tiempos cortos la activación de ERK es independiente de la actividad de P2RY2 (Figura 14b).

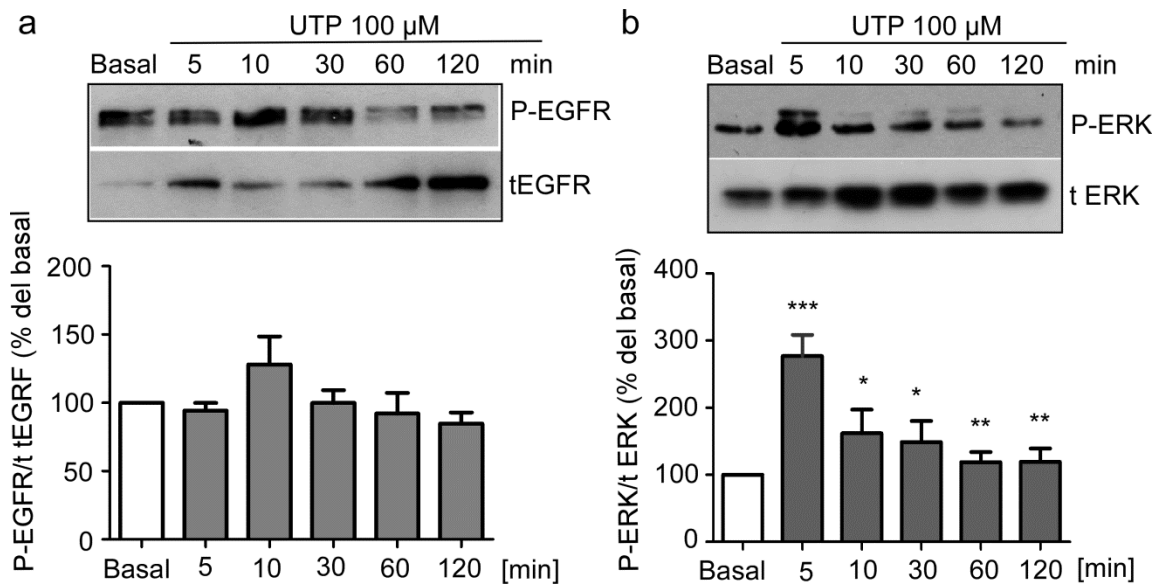


Figura 14.- **La pérdida de expresión del receptor P2RY2 inhibe la fosforilación de EGFR y de ERK inducidas por UTP.** a) Imágenes representativas de la abundancia del EGFR fosforilado (P-EGFR) y EGFR total (t EGFR) en células SKOV-3 P2RY2-KD incubadas con UTP 100 μ M por diferentes tiempos hasta 120 minutos, panel inferior cuantificación de la densidad óptica de las bandas de tres experimentos independientes; b) imágenes representativas de abundancia de ERK 1/2 fosforilado (P-ERK) y ERK total (t ERK) en células SKOV-3 P2RY2-KD incubadas con UTP 100 μ M hasta 120 minutos panel inferior cuantificación de la densidad óptica de las bandas de tres experimentos independientes. *** $p < 0.001$ Basal vs UTP 5 minutos, * $p < 0.05$ UTP 5 minutos vs UTP 10 minutos y UTP 5 minutos vs UTP 30 minutos, ** $p < 0.01$ UTP 5 minutos vs UTP 60 minutos y UTP 5 minutos vs UTP 120 minutos.

UTP incrementa la expresión de inductores de EMT

Se evaluó la expresión de Snail y Twist como inductores de la EMT en células SKOV-3 incubadas con UTP 100 μ M por diferentes tiempos (2, 16 o 26 horas).

Se observó que las células control y las incubadas por 2 horas con UTP no presentan expresión de ninguno de los factores de transcripción. A partir de las 16 horas se observó presencia del transcrito de ambos marcadores y su expresión se mantuvo hasta las 26 horas (Figura 15a). Debido a que en los experimentos de migración se incubaron las células por 12 horas, evaluamos la presencia de la proteína Snail por inmunoprecipitación y Western blot después de 12 horas de

incubación con UTP, observamos un incremento en la expresión de la proteína comparado con el cultivo control (459.8 ± 132.4 % del control). Como control positivo se utilizó, un extracto de células SKOV-3 previamente estimuladas con EGF 100 ng/mL (Figura 15b).

Por inmunofluorescencia se determinó la localización celular de Snail en el núcleo mostrando una traslocación mayor hacia el núcleo en las células tratadas con UTP por 12 horas (Figura 15c, flechas amarillas).

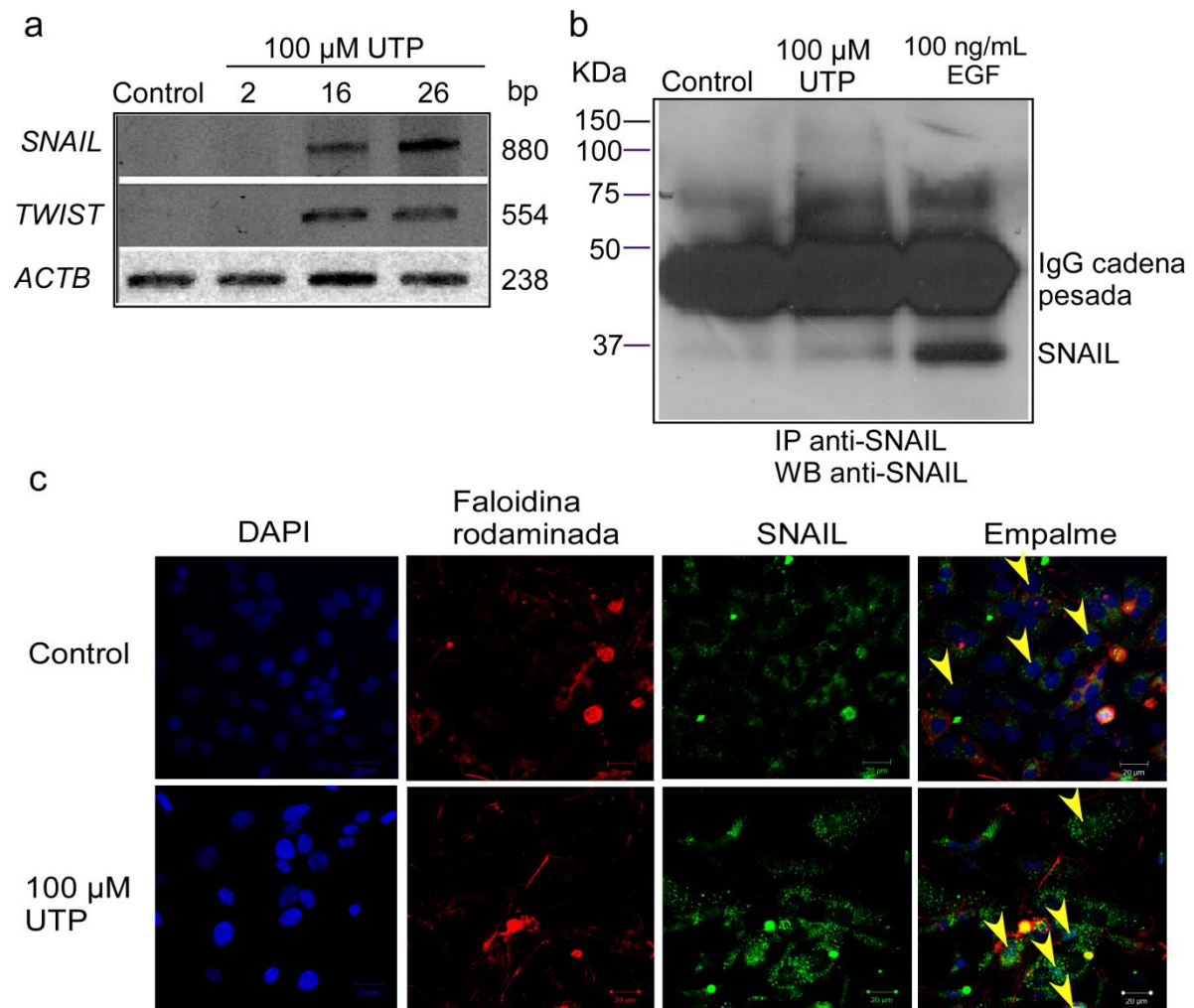


Figura 15.- El estímulo con UTP induce la expresión de los inductores de EMT en células SKOV-3. a) Imágenes representativas de la expresión de los transcritos de SNAIL, TWIST y ACTB en células SKOV-3 incubadas por 2, 16 y 26 horas con UTP 100 μ M; b) inmunoprecipitación de la proteína SNAIL en células SKOV-3 incubadas con UTP

100 μ M o EGF 100 ng/mL por 12 horas; c) marcaje por inmunofluorescencia de la proteína SNAIL en células SKOV-3 incubadas con UTP 100 μ M, en azul se muestra el marcaje de los núcleos con DAPI, en rojo la marca de los filamentos de actina con faloidina rodaminada y en verde la marca para SNAIL, las flechas amarillas señalan la presencia de SNAIL en la región nuclear.

UTP regula positivamente la expresión de los marcadores de EMT

La incubación por 12 horas con UTP genera un decremento significativo en la expresión de E-caderina comparado con las células control, sin embargo su localización fue en el citoplasma o en el núcleo, no así en las uniones adherentes como es característico de las células epiteliales. En claro contraste, las células incubadas con apirasa mostraron un patrón de expresión de la E-caderina exclusivamente en los contactos celulares. Como control se utilizó la incubación con apirasa desnaturalizada (previamente calentada a ebullición por 10 minutos), en ese caso se observó un patrón de expresión de E-caderina muy similar a las condiciones control (Figura 16).

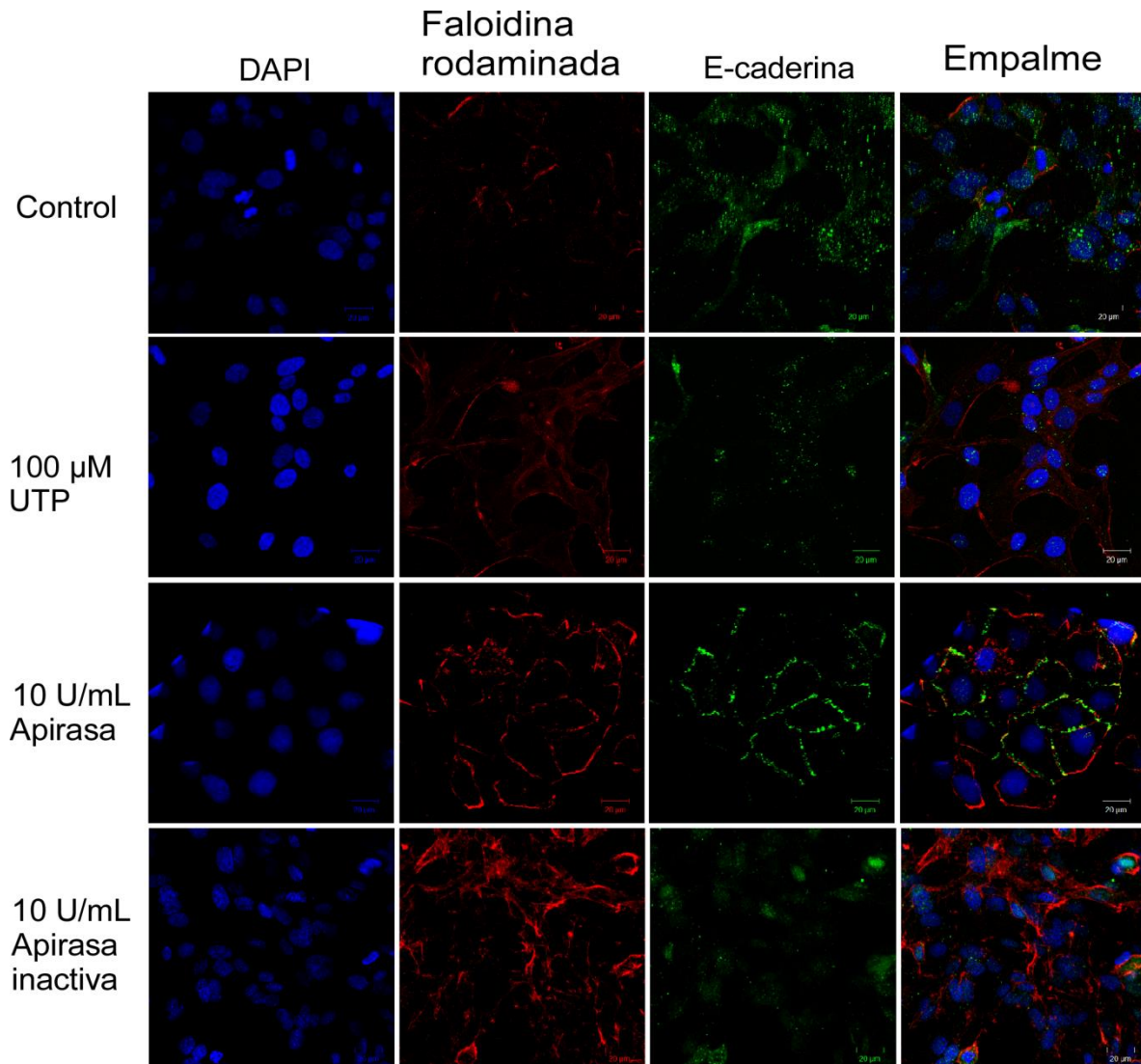


Figura 16.- **UTP induce una reducción de la expresión de E-caderina y apirasa mantiene la expresión de E-caderina en las uniones estrechas.** Marcaje por inmunofluorescencia de la proteína E-caderina en células SKOV-3 incubadas con UTP 100 μ M, Apirasa 10 U/mL y Apirasa inactiva 10 U/mL, en azul se muestra la marca de los núcleos con DAPI, en rojo la marca de los filamentos de actina con faloidina rodaminada y en verde la marca para E-caderina.

Con respecto a la expresión de vimentina observamos que las células que fueron incubadas con UTP mostraron una expresión claramente mayor que los cultivos control, y dicho aumento fue abolido preincubando a las células con AG1478 100 μ M. (Figura 17).

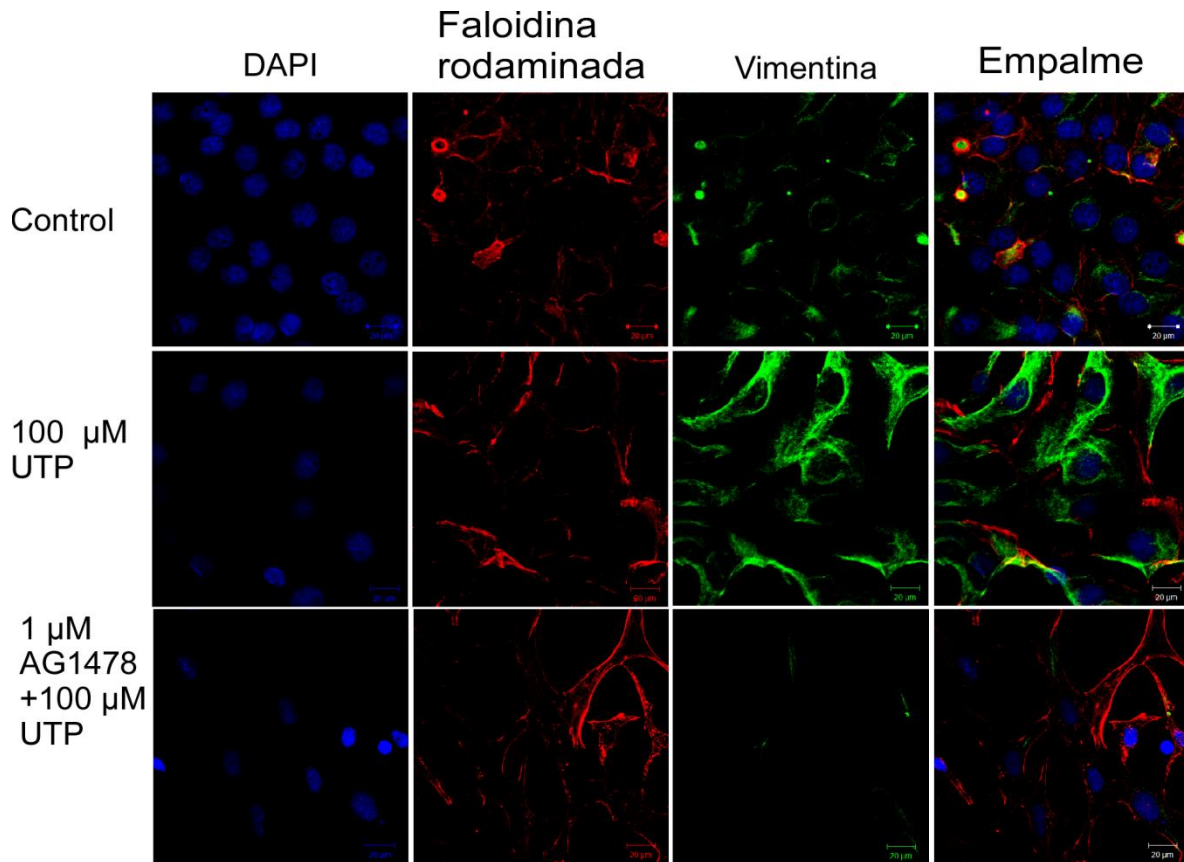


Figura 17.- **UTP induce un incremento en la expresión de vimentina que es inhibido con AG1478.** Marcate por inmunofluorescencia de la proteína Vimentina en células SKOV-3 incubadas con UTP 100 μ M y preincubadas con AG1478 1 μ M, en azul se muestra la marca de los núcleos con DAPI, en rojo la marca de los filamentos de actina con faloidina rodaminada y en verde la marca para Vimentina.

Resumiendo las observaciones obtenidas hasta este punto del proyecto podemos proponer que la señalización mediada por ATP y UTP sobre los receptores P2RY2 favorece el fenotipo mesenquimal y migratorio, por lo tanto favorecería también la inducción de metástasis.

El receptor P2RY2 puede llevar a la transactivación de los receptores de EGFR, por un mecanismo que involucra la actividad de la cinasa Src. La activación de estas vías de señalización promueve un incremento en la expresión de Snail y Twist, factores de transcripción que favorecen el proceso de EMT. Esta activación también está asociada a un incremento en el fenotipo mesenquimal, mayor expresión de vimentina y menor expresión de E-caderina. Finalmente se

puede observar un incremento en la migración celular inducida por nucleótidos como ATP y UTP, es decir, mediada por P2RY2.

Por otro lado se observó que la degradación de los nucleótidos extracelulares tras la adición de apirasa, se acompaña una reducción en la migración celular y de una relocalización de la expresión de E-caderina en las uniones adherentes. Este resultado sugiere que la liberación de nucleótidos, mantiene el fenotipo mesenquimal y su capacidad invasiva.

Este resultado puede interpretarse de dos formas distintas: por un lado que la defosforilación de los nucleótidos extracelulares y por lo tanto la falta de agonista para los receptores P2RY2 puede mantener el fenotipo epitelial y reducir la migración basal; o bien que los metabolitos defosforilados, actuando sobre sus receptores blanco favorecen el fenotipo epitelial y reducen la migración celular, específicamente planteamos la hipótesis de que los receptores ADORA pudieran tener un papel en el mantenimiento del fenotipo mesenquimal no migratorio. Decidimos abordar estas posibilidades en los experimentos siguientes.

La señalización mediada por receptores ADORA reduce de la migración basal

En el contexto del cáncer, la migración celular y la EMT son procesos muy importantes pues están directamente relacionados con la capacidad invasiva de los tumores. Desde este punto de vista, los efectos de la apirasa sobre células derivadas de carcinoma ovárico se revisten de gran importancia en el entendimiento de los mecanismos de comunicación intercelular que regulan estos procesos.

En los resultados de migración incubando a las células SKOV-3 con apirasa observamos que esta ectonucleotidasa tiene un efecto reduciendo alrededor del 50% de la migración basal. De este resultado se puede interpretar que los metabolitos defosforilados de los nucleótidos que están siendo liberados por las células SKOV-3 tienen un efecto reduciendo la migración y favoreciendo el establecimiento de un fenotipo epitelial. Con el fin de evaluar si el efecto de apirasa podía ser debido a la formación de adenosina diseñamos experimentos dirigidos al estudio del sistema adenosinérgico.

El primer experimento realizado consistió en inhibir a la ecto 5' nucleotidasa (NT5E o CD73), utilizando adenosina 5'-(α , β -metilen)difosfato (APCP). La incubación con dos concentraciones diferentes de APCP (50 y 5 μ M) mantuvieron el nivel de migración basal. En cultivos que fueron incubados con APCP y apirasa la migración se mantuvo similar al control. Este resultado sugiere que la actividad de apirasa inhibiendo la migración celular requiere de la actividad de la NT5E formando adenosina (Figura 18).

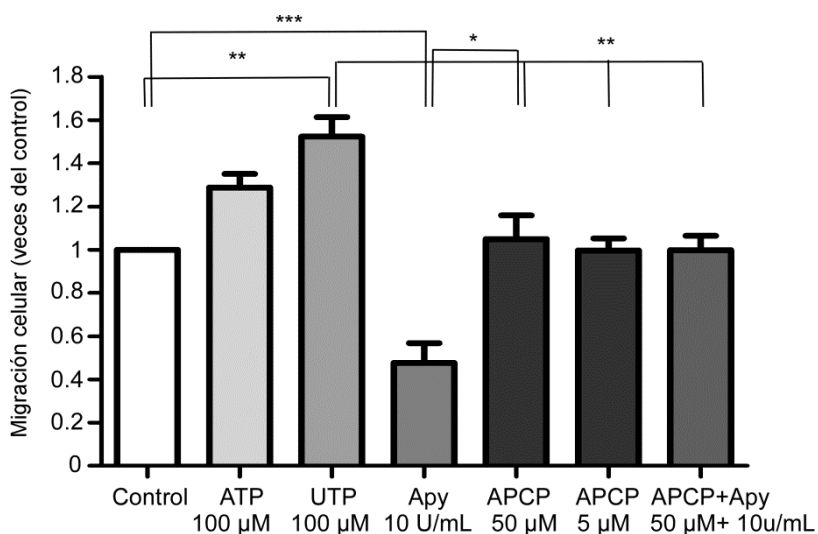


Figura 18.- **La inhibición de la actividad de la NT5E mantiene la migración basal.** Cuantificación de la migración en células SKOV-3 incubadas con ATP y UTP 100 μ M, apirasa 10 U/mL, APCP 50 y 5 μ M y APCP en presencia de apirasa. *** p <0.001 Control vs Apy, ** p <0.01 Control vs UTP, UTP vs APCP 50 μ M, UTP vs APCP 5 μ M y UTP vs APCP+Apy, * p <0.05 Apy vs APCP 50 μ M.

En segundo término se utilizó a la enzima adenosina deaminasa (ADA) en una concentración 2 U/mL, esta enzima cataliza la desaminación de la adenosina y lleva a la formación de inosina, de este modo inhibe la acción de adenosina sobre sus receptores blanco. La incubación con ADA mantuvo la migración en valores cercanos a los del cultivo control, aún en presencia de apirasa. Tomando en consideración estos experimentos es posible sugerir que los efectos inhibitorios de apirasa sobre la migración celular están mediados por la acumulación extracelular de adenosina y consecuentemente de su actividad sobre un receptor específico. No obstante cabe la posibilidad de que la adenosina formada en el

espacio extracelular sea transportada al citoplasma y de este modo los efectos observados sean debidos a la regulación de la energética celular.

Con el objetivo de aclarar esta disyuntiva, se utilizó dipiridamola (DPR) (200 μ M), un inhibidor de los canales transportadores concentradores de adenosina (CNT), a través de este tipo de transportadores, la adenosina entra al citoplasma y una vez en el espacio intracelular puede ser reciclada para la formación de nuevo ATP o bien puede tener otras funciones metabólicas. El bloqueo de estos transportadores mantiene disponible a la adenosina en el espacio extracelular. Tras la incubación con DPR se encontró que se reduce la migración hasta un 64.51 ± 2.63 % del basal. La incubación con DPR y apirasa redujo un 58.94 ± 8.94 % del basal, ambos resultados muestran una diferencia significativa con respecto al control (Figura 19). Estas observaciones sugieren que la adenosina producida extracelularmente tiene un efecto en la reducción de la migración basal, y sugiere que actúa activando alguno de sus receptores específicos (ADORA1, ADORA2A, ADORA2B o ADORA3).

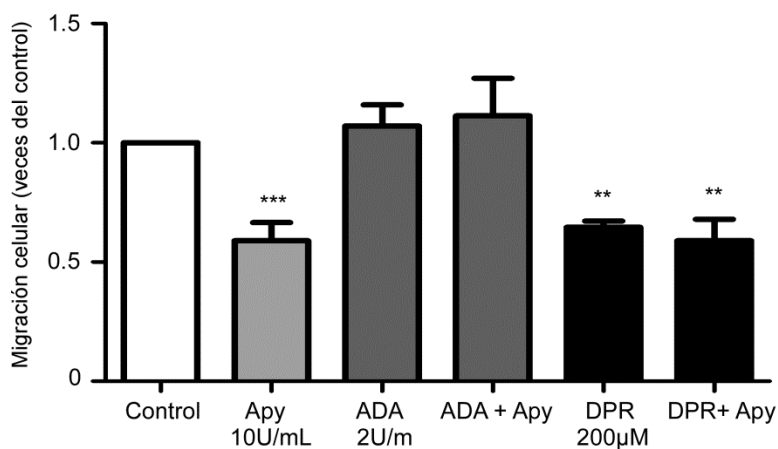


Figura 19.- **La adenosina extracelular reduce la migración celular basal.** Cuantificación de la migración celular en células SKOV-3 incubadas con apirasa 10 U/mL, adenosina deaminasa (ADA) 2 U/mL y ADA en presencia de apirasa, dipiridamola (DPR) y DPR en presencia de apirasa. *** $p < 0.001$ Control vs Apy, ** $p < 0.01$ Control vs DPR y Control vs DPR+Apy.

A continuación evaluamos el efecto de la adenosina (1, 10 y 100 μ M) sobre la migración celular, observamos que las tres concentraciones fueron efectivas para inducir una reducción significativa en la migración con respecto al control. Las concentraciones 10 y 1 μ M disminuyeron la migración al 69.54 ± 10.49 y $63.76 \pm$

11.39 % del basal respectivamente. Con la concentración de 100 μM se obtuvo un efecto mayor en la reducción de la migración que alcanzó el 36 ± 2.09 % del basal (Figura 20).

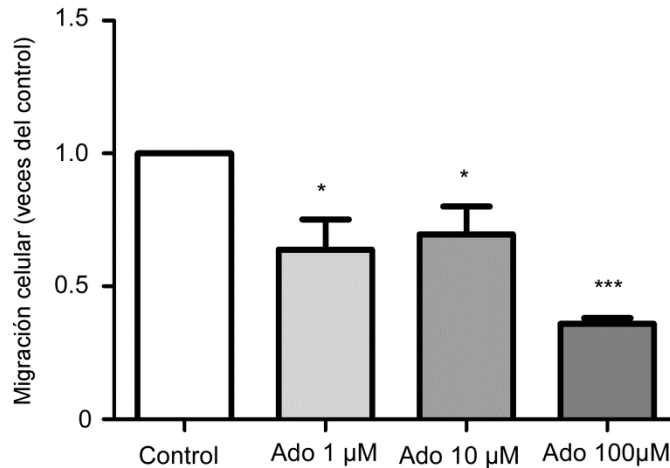


Figura 20.- **Adenosina induce una reducción en la migración basal.** Cuantificación de la migración celular inducida por adenosina a tres concentraciones 1, 10 y 100 μM . * $p < 0.05$ Control vs Ado 1 μM y Control vs Ado 10 μM , *** $p < 0.001$ Control vs Ado 100 μM .

Todos estos resultados en conjunto demuestran que la adenosina producida por acción de apirasa y NT5E extracelular induce una reducción en la habilidad migratoria de las células SKOV-3, por lo que resulta importante evaluar los mecanismos que llevan a la liberación de nucleótidos y a su degradación extracelular.

En primer término, con el fin de confirmar la capacidad de las células SKOV-3 para liberar ATP, determinamos la concentración del nucleótido en el medio extracelular en cultivos que fueron incubados por tres minutos en un medio libre de fosfatos. En estos análisis encontramos que las células SKOV-3 acumulan en tres min 164 ± 19.07 nM de ATP, mientras que con la incubación con apirasa una concentración de 49.53 ± 3.05 nM (Figura 21).

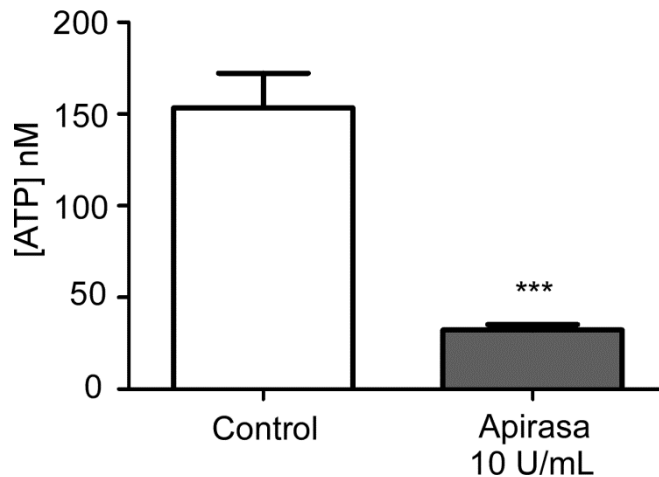


Figura 21.- **Las células SKOV-3 liberan ATP de manera constitutiva.** Cuantificación de la concentración de ATP en células SKOV-3 incubadas por 3 minutos en ausencia o presencia de apirasa 10 U/mL. *** $p < 0.001$ Control vs Apirasa.

Las células de cáncer expresan ectonucleotidasas

Debido a la importancia que reviste el procesamiento de ATP por ectonucleotidasas extracelulares, analizamos su expresión en las células SKOV-3.

Dado que observamos que la presencia de la ectonucleotidasa apirasa en el medio extracelular inducía la reducción en el nivel de migración celular basal, y que se puede observar un efecto similar cuando se incuba con adenosina, decidimos evaluar la expresión de un grupo de ectonucleotidasas membranales en las células derivadas de carcinoma ovárico.

Para comparar el nivel de expresión de las diferentes enzimas se incluyeron en el estudio dos líneas celulares más, la línea de carcinoma ovárico OVCAR-3 que presentan el mismo origen tumoral que las SKOV-3, y las células metastásicas de cáncer de mama MDA-MB-231, que se ha reportado que expresan diferentes ectonucleotidasas.

Por PCR cuantitativo se evaluó la cantidad relativa de cada uno de los transcritos de las enzimas ENTPD1, ENTPD3, ENPP1, ENPP3, ALPL, ALPP y NT5E como transcrito de referencia a la β -tubulina (TUBB).

Se encontró que las líneas celulares evaluadas no expresan a la familia de ectonucleotidasas ENTPD (ENTPD 1 y 3), expresan en cambio a la ENPP1 que es una enzima capaz de defosforilar nucleótidos de adenina hasta AMP y nucleótidos de uridina hasta UDP. Análisis más detallados mostraron expresiones significativamente mayores de las enzimas ENPP1 y NT5E en las líneas OVCAR-3 y MDA-MB-231 en comparación con las células SKOV-3. La línea celular OVCAR-3 expresa a la forma ubicua de la fosfatasa alcalina (ALPL), mientras que las células SKOV-3 y MDA-MB-231 expresan a la isoforma llamada placentaria (ALPP) (Figura 22). De esta forma observamos que las células SKOV-3 expresan un grupo de enzimas que les permiten degradar a los nucleótidos en sus diferentes metabolitos y que pueden llevar a la producción de adenosina.

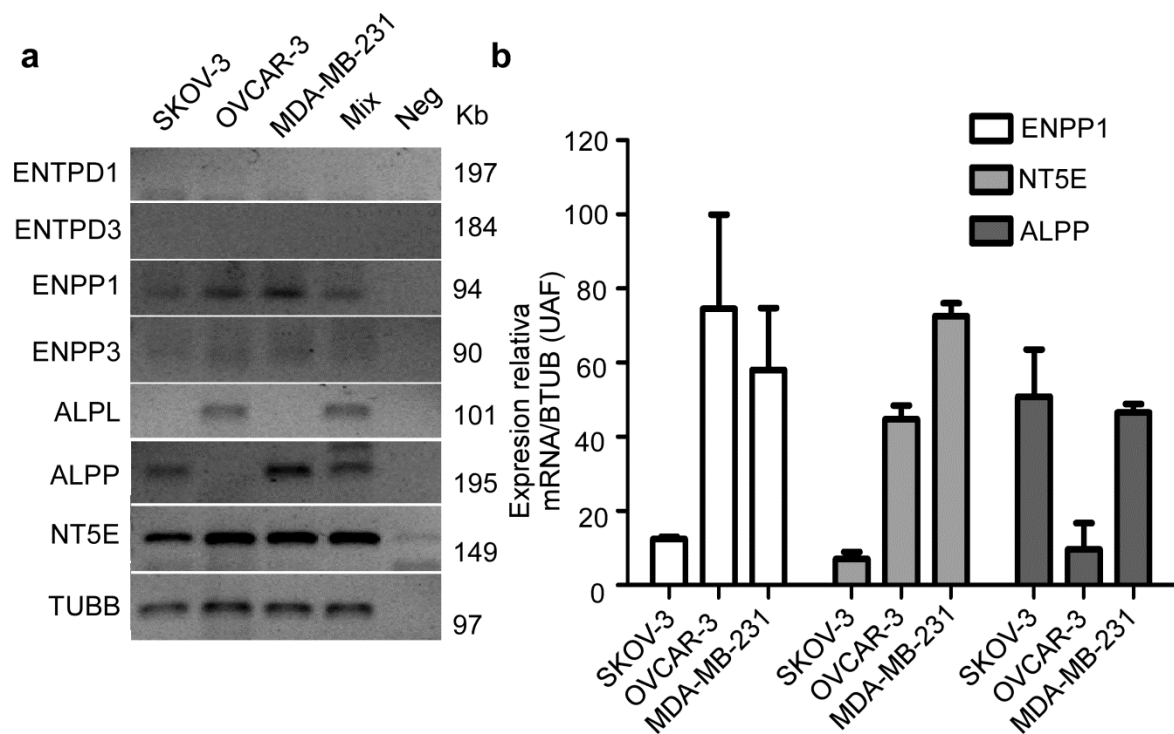


Figura 22.- Expresión de las ectonucleotidasas membranales en células de cáncer de ovario y de mama. a) Imágenes representativas de presencia de los transcritos de las diferentes ectonucleotidasas membranales en las líneas celulares SKOV-3, OVCAR-3 y MDA-MB-231; b) Cuantificación de la expresión relativa de las ectonucleotidasas ENPP1, NT5E y ALPP con respecto a la expresión de β -tubulina (BTUB) en unidades arbitrarias de fluorescencia (AUF).

La adenosina induce una reducción en la EMT

Para evaluar el efecto de adenosina sobre la EMT se evaluó la expresión de la E-caderina y de la β -catenina, que son proteínas que se localizan en las uniones adherentes en las células epiteliales. Se incubaron las células por 12 horas con apirasa, adenosina o AMP. Se mostró que E-caderina se encontraba en las uniones celulares en células tratadas con apirasa, con adenosina o con AMP, pero no en las células control (Figura 23a).

En cuanto a la localización de β -catenina se encontró que en los cultivos control esta proteína se puede observar en las uniones celulares, la incubación con UTP induce una traslocación hacia el citoplasma y la región nuclear, mientras que el tratamiento con adenosina o apirasa mantiene el fenotipo epitelial y la expresión de β -catenina se observa en las uniones estrechas (Figura 23b).

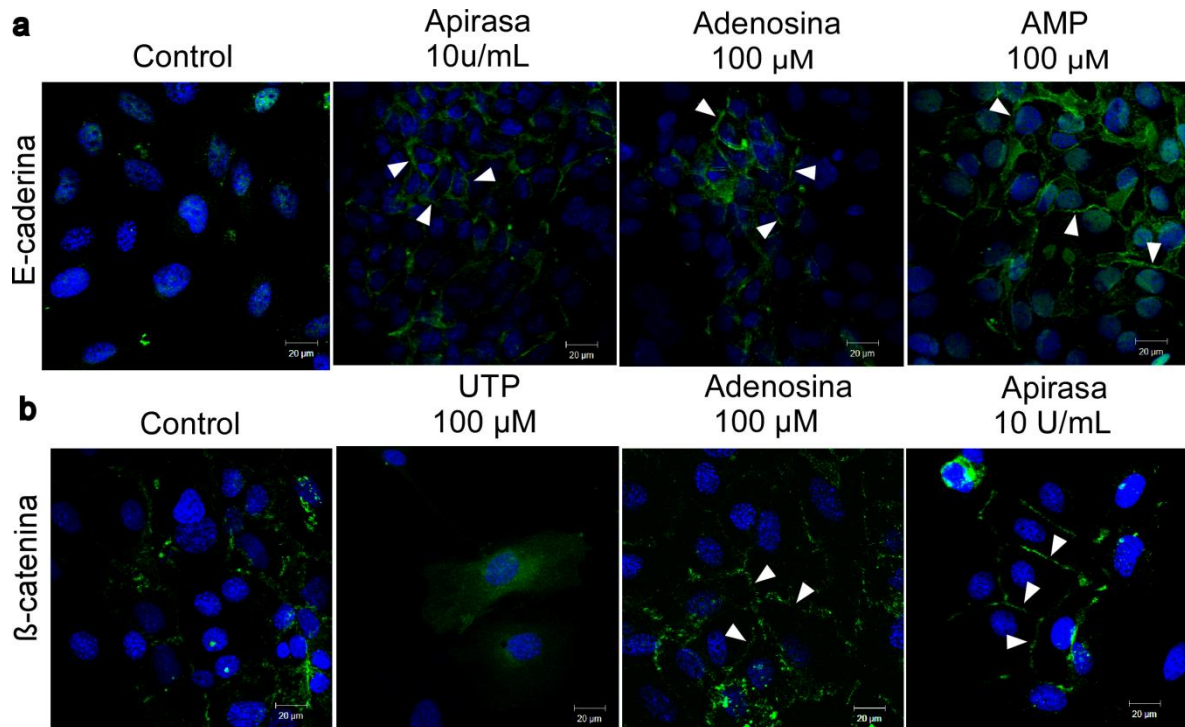


Figura 23.- La **Adenosina favorece la presencia de E-caderina y de β -catenina en las uniones celulares**. a) Marcaje por inmunofluorescencia de la proteína E-caderina en células SKOV-3 incubadas con Apirasa 10 U/mL, Adenosina 100 μ M y AMP 100 μ M, en azul se muestra la marca de los núcleos con DAPI y en verde la marca para E-caderina; b) Marcaje por inmunofluorescencia de la proteína β -catenina en células SKOV-3 incubadas con UTP 100 μ M, adenosina 100 μ M y apirasa 10 U/mL, en azul se muestra la

marca de los núcleos con DAPI y en verde la marca para β -catenina. Las flechas muestran la presencia de ambas proteínas en las uniones celulares.

Las células SKOV-3 expresan al receptor ADORA2B

Nuestros datos farmacológicos analizando el papel de la apirasa sobre la migración celular y la inducción del proceso de EMT en células SKOV-3 indican que la adenosina es un inductor del fenotipo epitelial en células derivadas de carcinoma ovárico, por lo tanto alguno de los receptores sensibles a adenosina pueden estar participando en la respuesta observada, la farmacología para esta familia de receptores es más específica, pero es necesario saber cuáles receptores expresan las células del modelo de estudio. En un reporte previo se encontró que los cuatro receptores ADORA están presentes en la células SKOV3, así como en otras dos líneas celulares derivadas de cáncer ovárico CAOV-3 y OVCAR-3, las tres líneas expresan en mayor proporción al receptor ADORA2B (Hajiahmadi et al., 2015).

Decidimos corroborar el reporte previo en las células SKOV-3, utilizando oligonucleótidos específicos para los cuatro receptores ADORA se estudió el patrón de expresión de estos en las células SKOV-3 y se utilizaron como controles a las células de carcinoma de mama MCF-7 y MD-MB-231.

Encontramos que las células de cáncer de mama expresan a los receptores ADORA2A y ADORA2B, mientras que solo fue posible encontrar la presencia del mensajero de ADORA2B en las células SKOV-3 a diferencia del reporte previo. Se utilizó la presencia del mensajero de la GAPDH como control de amplificación y al cDNA de esta enzima como control positivo (Figura 24). Se utilizaron a las células MCF-7 y MDA-MB-231 que son derivadas de cáncer de mama como controles, estas dos líneas expresan además a los receptores ADORA2A. Los juegos de oligonucleótidos para realizar la PCR de los cuatro receptores ADORA habían sido utilizados previamente con resultados positivos en células de glioblastoma humanas (Daniele et al., 2014).

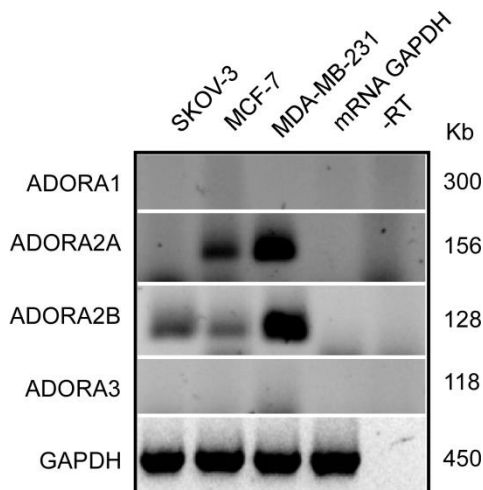


Figura 24.- **Expresión de los receptores ADORA en células derivadas de cáncer de ovario y mama.** Imágenes representativas de la presencia de los transcritos de los receptores ADORA en las líneas celulares SKOV-3, MCF-7, MDA-MB-23.

En resumen en esta parte del proyecto observamos que la adenosina está regulando a la baja la migración de las células SKOV-3 y mantiene el fenotipo epitelial, posiblemente este efecto es mediado por el receptor ADORA2B, pero es necesario utilizar las herramientas farmacológicas adecuadas para establecer su relación.

Discusión

El receptor P2RY2 induce EMT y migración celular

El carcinoma ovárico es una patología con una alta mortalidad en las pacientes que la padecen, debido principalmente a su difícil diagnóstico (Narod, 2016). La mayoría de las pacientes son diagnosticadas en etapas avanzadas de la enfermedad, cuando ya se presenta metástasis. El proceso de diseminación de un tumor primario requiere que las células adquieran características invasivas. Se ha propuesto que las células del OSE que tienen un origen mesotelial pueden pasar por el proceso de transición epitelio mesénquima en cada ciclo ovulatorio, además dado que se conoce que estas células tienen la capacidad de secretar enzimas proteolíticas se propone que participan activamente en la ruptura de la membrana basal, de la matriz extracelular y el estroma ovárico. En este proceso la EMT participa en la remodelación de la capa del OSE y se ha sugerido que un proceso aberrante puede llevar a la acumulación de células epiteliales dentro del estroma

ovárico formando quistes de inclusión que frecuentemente se convierten en los sitios donde aparecen los tumores epiteliales primarios (Fleming et al., 2006).

La EMT es un mecanismo central para la adquisición de un fenotipo invasivo. La migración invasiva es un proceso que puede ser activado por diferentes moléculas de señalización a nivel autócrino y parácrino (Thiery et al., 2009), que involucra factores de crecimiento, señales inflamatorias y citocinas (Ahmed et al., 2007).

Por otro lado está bien establecido que los nucleótidos que tienen un claro papel en la señalización intracelular, son liberados al espacio extracelular y ejercen efectos específicos y/o moduladores a través de activar diferentes receptores membranales. En el intersticio tumoral se pueden alcanzar concentraciones de ATP que se encuentran en el rango de 700 μM , concentraciones que son suficientes para activar a cualquiera de los receptores purinérgicos (Pellegatti et al., 2008). También hay antecedentes que relacionan la actividad de los nucleótidos y de los receptores purinérgicos en diferentes modelos de cáncer con respecto a la inducción de migración y EMT (Burnstock and Di Virgilio, 2013).

Considerando lo anterior decidimos estudiar el papel extracelular de nucleótidos sobre la migración celular y la inducción de EMT en el modelo de células cancerosas de ovario.

Como primer objetivo se analizó la participación de ATP, UTP y UDP en la migración celular. Observamos que ATP o UTP inducen migración mientras que UDP no tuvo efectos. Los resultados también mostraron que al degradar a los nucleótidos liberados por el propio cultivo, adicionando la ectonucleotidasa apirasa la migración disminuía incluso por debajo del nivel observado en condiciones basales. Un efecto similar inducido por UTP o ATP incrementando la migración había sido previamente observado en células epiteliales corneales humanas (Kehasse et al., 2013).

Una cuestión importante fue dilucidar la identidad del receptor que regula el efecto migratorio. De acuerdo con la farmacología de los receptores purinérgicos se sabe que los receptores P2RY2 y P2RY4 son los únicos receptores sensibles a UTP, suramina que es un antagonista para diferentes receptores P2RY puede inhibir la actividad de P2RY2 pero no de P2RY4 (von Kügelgen and Hoffmann, 2015). En ensayos de migración celular se encontró que suramina puede bloquear la migración inducida por UTP, pero cuando es aplicado solo no es capaz de

inhibir la respuesta de migración basal. Por los resultados obtenidos dedujimos que el receptor implicado en la respuesta de migración observada involucra al receptor P2RY2. En diferentes condiciones fisiológicas y en algunos modelos de cáncer se había observado un efecto de este receptor en la inducción de migración celular (Boucher et al., 2010; Chadet et al., 2014; Ferreira and Schlichter, 2013; Jin et al., 2014c, 2014c; Lamarca et al., 2014; Li et al., 2015; Wiedon et al., 2012; Xie et al., 2014). Este hecho fue confirmado por experimentos de inhibición de la expresión del receptor P2RY2. Estos experimentos fueron realizados transfectando a las células SKOV-3 con una mezcla de tres plásmidos que contenían un shRNA con una secuencia blanco para P2RY2, con esta herramienta logramos reducir prácticamente todo el mRNA de P2RY2 y no fue posible encontrar presencia de la proteína en las células P2RY2-KD.

En células P2RY2-KD se encontró que la aplicación de UTP no es capaz de inducir aumento en la migración celular. Por lo tanto podemos decir que el receptor P2RY2 participa en la respuesta migratoria inducida por UTP. Estudios recientes en el modelo de células de cáncer de próstata también han reportado que el receptor P2RY2 es responsable de inducir migración e invasión (Li et al., 2015), por lo que esta propiedad de P2RY2 de inducir migración celular e invasión puede ser un mecanismo general en células de cáncer.

Está bien establecido que el receptor P2RY2 puede transactivar al receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) en modelos como células de músculo liso arteriales y células papilares de las glándulas salivales (Norambuena et al., 2010; Ratchford et al., 2010). También se sabe que EGF es un fuerte inductor de EMT y migración en diferentes modelos de cáncer (Pala et al., 2012; Takeuchi and Yano, 2014). Las evidencias generadas en este proyecto permiten sugerir la trasactivación del EGFR mediada por P2RY2, estas evidencias son las siguientes: a) la incubación con UTP lleva a un incremento en la fosforilación de Y1068 de EGFR, b) UTP induce un incremento en la proteína fosforilada de ERK 1/2 y este efecto en la fosforilación puede ser inhibido en tiempos prolongados (a partir de 30 minutos) cuanto se incubaba además con AG1478 un inhibidor de la actividad de cinasa de tirosina de EGFR, c) cuando se incuban células P2RY2-KD con UTP no se observa incremento en la fosforilación de EGFR ni de ERK en tiempos prolongados (30 y 60 minutos).

Una regulación equivalente ha sido observada en células epiteliales corneales humanas en las que la incubación con ATP incrementó la fosforilación de EGFR en tirosinas 974, 1068 y 1148 (Kehasse et al., 2013).

Nuestras observaciones sugieren que la migración celular requiere la participación de la cinasa Src y de la ruta transduccional PI3K-AKT, pues el aumento en la migración celular fue sensible a inhibidores específicos de dichas enzimas. Un mecanismo equivalente ha sido descrito utilizando células de astrocitoma 1321N1 (Liu et al., 2004).

El cambio fenotípico de las células epiteliales para la adquisición de características migratorias e invasivas involucra el proceso de EMT. Cuando se activan diferentes vías de señalización, como por ejemplo la de TGF- β o la de EGF, conllevan a la expresión de los llamados inductores de EMT, también conocidos como represores de la expresión de E-caderina. La pérdida de la expresión de esta proteína es considerado un paso crucial en la progresión de la EMT (Thiery et al., 2009). Elegimos analizar a los más estudiados que son Snail y Twist y evaluamos la expresión de ambos en condiciones control y en el tratamiento de las células SKOV-3 con UTP 100 μ M. Encontramos que el mensajero de ambos factores de transcripción no se detecta en condiciones control y se induce su expresión a partir de 16 horas de incubación con UTP.

También se observó un incremento en la proteína de Snail en las células incubadas con UTP comparadas con el control y en este caso como se sabe que EGF es un fuerte inductor de EMT se utilizó como control positivo, además también se encontró presencia de Snail en el núcleo de las células tratadas con UTP sugiriendo su activación como factor de transcripción. Estos resultados nos muestran que UTP puede incrementar la expresión y activación de los inductores de EMT. Se ha demostrado que la sobreexpresión de Snail y Slug en células SKOV-3 llevan a una reducción en la expresión de E-caderina, a un incremento en marcadores mesenquimales como CK18 y Vimentina y a un incremento en la motilidad e invasividad (Kurrey et al., 2005).

En congruencia con lo anterior, nuestros resultados mostraron que la incubación con UTP favorece el fenotipo mesenquimal disminuyendo la expresión de E-caderina e incrementando la de vimentina, efecto que también parece ser mediado por la trasactivación de EGFR. Por otro lado en las células SKOV-3 incubadas con apirasa se observó que la localización de la E-caderina se mantiene en las uniones celulares, sugiriendo que la ausencia de nucleótidos o en la presencia de algún metabolito de estos, permite el mantenimiento del fenotipo epitelial.

Se ha reportado que los tumores ováricos primarios expresan E-caderina y que su expresión se reduce en tumores de alto grado, también se ha reportado una fuerte expresión de esta proteína en tumores secundarios, por lo que se sugiere que la EMT es un requisito en la adquisición del fenotipo metastásico, mientras que la expresión de la E-caderina en tumores secundarios obedece a la reversión de la EMT permitiendo el crecimiento tumoral en sitios remotos (Ahmed et al., 2007).

La adenosina favorece el fenotipo epitelial y reduce la migración celular

Además del efecto mediado por el receptor P2RY2, otro de los efectos importantes observados en los experimentos de migración es que la incubación con apirasa reduce la migración por debajo del nivel basal, en estos experimentos la apirasa se agregó de manera independiente a los cultivos, por lo que sugiere que el nivel de migración basal depende de la liberación de ATP al medio extracelular por las propias células, es decir que es de naturaleza autócrina/parácrina. Bajo esta premisa pensamos en dos posibilidades que pueden llevar a la reducción de la migración: la disminución de la concentración de ATP o bien la acumulación de algún metabolito del nucleótido. Ya se había probado el efecto de UDP y no se mostró una diferencia clara con el nivel de migración basal, por lo que descartamos la participación del receptor P2RY6. El ATP puede ser rápidamente degradado a ADP o AMP por acción de apirasa, ADP puede activar con diferente sensibilidad a los receptores P2RY1 y P2RY13, mientras que no se ha encontrado algún receptor que sea sensible a AMP (von Kügelgen and Hoffmann, 2015).

En primer término analizamos la posibilidad de que el efecto inhibitorio de la migración dependiera de la formación de adenosina, dado que existen estudios que muestran el papel de este nucleósido en la inhibición de diferentes procesos de las células de cáncer, como inhibición de la proliferación o inducción de apoptosis, o supresión de la respuesta inmunológica (Daniele et al., 2014; Häusler et al., 2014, 2011; Sychala, 2000). Existen dos enzimas que pueden formar adenosina a partir de AMP, la NT5E o CD73 y la fosfatasa alcalina.

Como consecuencia de una serie de experimentos utilizando diferentes herramientas farmacológicas encontramos que la formación de adenosina puede llevar a la inhibición de la migración celular, las evidencias son las siguientes: a) La inhibición de la NT5E con APCP mantiene los niveles de migración sin cambio

con respecto al nivel basal; b) la incubación con ADA, mantiene la migración similar a las condiciones control; y c) La incubación con DPR indujo una reducción en el nivel de migración basal. El conjunto de estos resultados demuestran que la acumulación de adenosina extracelular producida por las ectonucleotidasas a partir del AMP producido por apirasa es responsable de la inhibición de la migración celular basal.

Esta propuesta se corroboró mediante la incubación de las células con tres diferentes concentraciones de adenosina y se observó que todas inducen una reducción en la migración basal, siendo más efectiva la dosis de 100 μ M.

Estos resultados muestran la importancia de la concentración de nucleótidos y nucleósidos en el medio extracelular. Por un lado ATP y UTP pueden favorecer las características metastásicas como la migración celular, pero por otro lado su degradación y la actividad de adenosina han mostrado inhibir dicho proceso.

En un trabajo previo desarrollado por nuestro grupo se encontró que las células SKOV-3 presentaban incrementos en la concentración de Ca^{2+} intracelular cuando eran estimuladas mecánicamente por una descarga de solución extracelular. Además este aumento era sensible a la presencia de apirasa, lo que sugería que tras la estimulación mecánica las células liberaban ATP que activaba receptores P2 (Vázquez-Cuevas et al., 2014). En el presente trabajo mostramos que los cultivos liberan una concentración de ATP de alrededor de 160 nM/3 min, y que en las células incubadas con apirasa se reduce significativamente la concentración de ATP hasta cerca de 50 nM. Mostrando que el tratamiento con apirasa es efectivo para modular la cantidad de ATP en el medio extracelular y que los resultados observados con el uso de esta enzima en la migración celular podría deberse a la producción de metabolitos defosforilados.

Otro de los factores que contribuyen a la presencia o ausencia de nucleótidos en el medio extracelular son las ectonucleotidasas, el bloqueo de la NT5E con APCP que inhibe el efecto de apirasa sobre la migración celular sugería que esta enzima estaba presente en las células SKOV-3, sin embargo desconocíamos el patrón de expresión de éstas. Evaluamos la presencia de los mRNAs de diferentes enzimas que se sabe que son membranales, estas son las ENTPD1 y 3, la ENPP1 y 3, la ALPL y su isoforma llamada placentaria ALPP, y la NT5E o CD73. En este caso se llevó a cabo PCR cuantitativa y se utilizaron dos líneas celulares más para comparar la expresión de las nucleotidasas en las

células SKOV-3, éstas fueron la línea OVCAR-3 que son derivadas de carcinoma ovárico y la línea MDA-MB-231 de carcinoma mamario.

En estas tres líneas celulares encontramos que la familia de ectonucleotidasas ENTPD no está expresada, encontramos que la expresión de ENPP1 fue más abundante en las células OVCAR-3 y MDA-MB-231 que en las células SKOV-3. Las células metastásicas SKOV-3 y MDA-MB-231 expresan a la isoforma placentaria de la fosfatasa alcalina, mientras que las células OVCAR-3 expresan a la isoforma no específica de tejido. Finalmente se encontró una fuerte expresión de la NT5E en las tres líneas celulares, aunque se encontró una mayor expresión en las células OVCAR-3 y MDA-MB-231 con respecto a las células SKOV-3. Estos resultados indican una elevada expresión de las nucleotidasas en las líneas celulares altamente metastásicas comparado con aquellas células que presentan un fenotipo más epitelial; sugiriendo implicaciones en la capacidad invasiva de los distintos tipos celulares. Para completar estas observaciones será necesario un análisis detallado de la concentración de nucleótidos y nucleósidos extracelulares en condiciones basales para relacionarlo con la actividad de las ectonucleotidasas y además para pensar en la actividad de los distintos receptores purinérgicos que se vería favorecida.

Para estudiar el papel de la adenosina en el proceso de EMT se evaluó la localización de la E-caderina en células incubadas además con AMP y adenosina y se encontró un resultado similar a lo que se había observado previamente incubando a las células con apirasa, lo que demuestra que el efecto observado pudiera ser mediado por la defosforilación de los nucleótidos, ya se mencionó que AMP no tiene receptores blanco conocidos por lo que se plantea la hipótesis de que este nucleótido pueda ser metabolizado y llevar a la producción de adenosina.

β -catenina es una proteína intracelular que participa en la formación de las uniones adherentes entre las células. Cuando E-caderina se encuentra en la membrana celular, la β -catenina se encuentra estrechamente unida a ésta, por lo que se considera un marcador del fenotipo epitelial, cuando no se encuentra unida a E-caderina y la vía de Wnt se encuentra inactiva, β -catenina se fosforila en residuos de serina y treonina en su extremo carboxilo y se lleva a degradación por el proteasoma; si la vía de Wnt se encuentra activa por la unión del ligando Wnt a su receptor Frizzled entonces β -catenina escapa de la fosforilación y se trasloca al núcleo donde puede inducir la expresión de factores de expresión que son inductores de EMT (Weekes and Winn, 2011). Tras la incubación con UTP, β -catenina presentaba una localización citoplásmica-nuclear, mientras que en

condiciones control y en presencia de adenosina y apirasa se encontraba en las uniones celulares. Estos resultados refuerzan el hecho de que el receptor P2RY2 induce EMT mientras que la degradación de los nucleótidos con apirasa o la adición de adenosina mantienen un fenotipo epitelial en las células SKOV-3.

Recientemente se evaluó la expresión de los receptores ADORA en tres líneas diferentes de células derivadas de carcinoma ovárico que son las células SKOV-3, OVCAR-3 y CAO-4. En las tres líneas celulares se encontraron la presencia de los mRNAs y proteínas de los cuatro receptores ADORA (ADORA1, ADORA2A, ADORA2B, ADORA3). En los tres casos los receptores ADORA2B y ADORA3 eran los que presentaban una expresión más abundante, y además se demostró su funcionalidad por el ensayo de acumulación a cAMP. En un estudio paralelo demostraron que el receptor ADORA2b induce apoptosis en las células de carcinoma ovárico (Hajiahmadi et al., 2015a, 2015b). También se observó un efecto del receptor ADORA2B induciendo apoptosis, a través de la actividad de caspasas en un modelo de células troncales de glioblastoma (Daniele et al., 2014).

Con base en estos antecedentes analizamos la presencia de los transcritos de los cuatro receptores en las células SKOV-3, y a diferencia de lo reportado anteriormente, nosotros solamente encontramos expresión del receptor ADORA2B. Este resultado sugiere que este receptor es el responsable de la respuesta de reducción de la migración y mantenimiento del fenotipo epitelial.

Recientemente se reportó que la actividad de la PKA, como consecuencia de un incremento en la concentración del segundo mensajero cAMP, puede llevar a la reprogramación epigenética a través de modificación de histonas. Este efecto conduce al proceso de transición mesénquima-epitelio en células mesenquimales mamarias humanas y además lleva a una pérdida en la habilidad de desarrollar tumores (Pattabiraman et al., 2016). Los receptores ADORA2B pueden estar acoplados a la proteína Gas, o a la Gαq, lo que significa que podrían promover la actividad de la adenilato ciclasa y favorecer la producción de cAMP, o bien activar a la PLC y a la producción de los segundos mensajeros DAG e IP3, de modo que nuestros resultados están de acuerdo con estas observaciones (Sheth et al., 2014).

Resulta necesario explorar si el receptor ADORA2B puede ser responsable de la reducción en la migración celular basal y el mecanismo a través del cual se lleva a cabo este proceso, como perspectivas de este trabajo se evaluará su participación con herramientas farmacológicas y genéticas, además de que resulta

necesario también evaluar la posible vía de señalización que regula dichos procesos.

En resumen nuestros resultados muestran que el ambiente extracelular de nucleótidos y sus enzimas transformadoras pueden favorecer ya sea un fenotipo epitelial poco migratorio, o uno mesenquimal con un elevado índice de migración celular. Mientras que un predominio de ATP o UTP activando a los receptores P2RY2 puede inducir un fenotipo metastásico, el incremento en adenosina, resultado de la actividad de las ectonucleotidasas y actuando sobre los receptores ADORA puede mantener el fenotipo epitelial e inhibir la migración.

Los resultados farmacológicos encontrados en el presente trabajo representan un mecanismo por medio del cual se puede modular la actividad de los receptores purinérgicos, incidiendo en la respuesta fisiológica de inducción o inhibición del fenotipo invasivo. Tendría que evaluarse si es un mecanismo general en células metastásicas, que pudiera tener implicaciones en la quimioterapia del carcinoma.

Conclusiones

- El receptor P2RY2 induce migración de las células SKOV-3.
- El receptor P2RY2 transactiva al receptor EGFR por un mecanismo que involucra la actividad de la cinasa Src.
- El receptor P2Y2 induce EMT en las células SKOV-3, reduce la expresión del marcador epitelial E-caderina e incrementa la expresión del marcador mesenquimal vimentina.
- La defosforilación de los nucleótidos extracelulares con apirasa reduce la migración basal y mantiene el fenotipo epitelial.
- La adenosina extracelular reduce la migración y mantiene E-caderina y B-catenina en la membrana celular.
- Las células SKOV-3 expresan a las enzimas que metabolizan a los nucleótidos.
- Las células SKOV-3 liberan concentraciones nanomolares de ATP en condiciones basales y apirasa es capaz de disminuir significativamente la concentración de ATP extracelular.

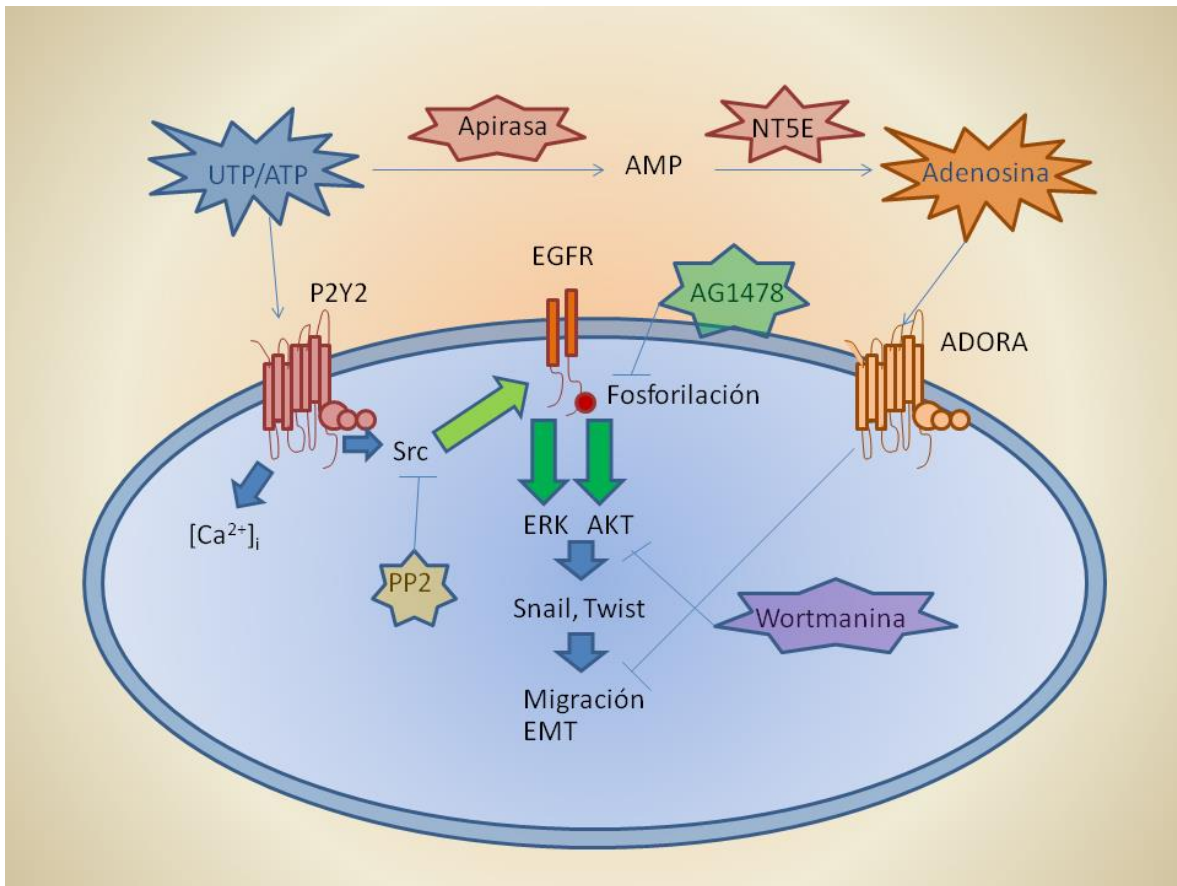


Figura 25.- **Mecanismo propuesto para la inducción de EMT y migración o su inhibición mediada por los receptores purinérgicos.** En las células SKOV-3 los nucleótidos extracelulares ATP o UTP activan al receptor purinérgico P2RY2, la actividad río abajo de este receptor lleva además de su actividad canónica activando a la proteína Gq a la actividad de la cinasa Src, esta lleva a la fosforilación del EGFR y a la activación de las vías de ERK1/2 y AKT, a un incremento en la expresión de los factores de transcripción Snail y Twist que promueven la represión de la expresión de E-caderina y a su diferente localización celular, así como al incremento en la expresión de vimentina, el receptor P2RY2 induce también un incremento en la migración celular. Por otro lado, la degradación del ATP liberado por las células por la acción de las ectonucleotidasas lleva a la producción de adenosina que actuando sobre sus receptores blanco, posiblemente el receptor ADORA2B, inhibe la migración basal y favorece el fenotipo epitelial.

Referencias

Abbracchio, M.P., and Burnstock, G. (1994). Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol. Ther.* *64*, 445–475.

Adinolfi, E., Raffaghello, L., Giuliani, A.L., Cavazzini, L., Capece, M., Chiozzi, P., Bianchi, G., Kroemer, G., Pistoia, V., and Di Virgilio, F. (2012). Expression of P2X7 receptor increases in vivo tumor growth. *Cancer Res.* *72*, 2957–2969.

Ahmed, N., Thompson, E.W., and Quinn, M.A. (2007). Epithelial-mesenchymal interconversions in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas: an exception to the norm. *J. Cell. Physiol.* *213*, 581–588.

Appert-Collin, A., Hubert, P., Crémel, G., and Bennisroune, A. (2015). Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion. *Front. Pharmacol.* *6*, 283.

Azimi, I., Beilby, H., Davis, F.M., Marcial, D.L., Kenny, P.A., Thompson, E.W., Roberts-Thomson, S.J., and Monteith, G.R. (2016). Altered purinergic receptor-Ca²⁺ signaling associated with hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Mol. Oncol.* *10*, 166–178.

Bilbao, P.S., Santillán, G., and Boland, R. (2010). ATP stimulates the proliferation of MCF-7 cells through the PI3K/Akt signaling pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* *499*, 40–48.

Block, E.R., Tolino, M.A., and Klarlund, J.K. (2011). Extracellular ATP stimulates epithelial cell motility through Pyk2-mediated activation of the EGF receptor. *Cell. Signal.* *23*, 2051–2055.

Boucher, I., Rich, C., Lee, A., Marcincin, M., and Trinkaus-Randall, V. (2010). The P2Y2 receptor mediates the epithelial injury response and cell migration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *299*, C411–C421.

Bulanova, E., Budagian, V., Orinska, Z., Hein, M., Petersen, F., Thon, L., Adam, D., and Bulfone-Paus, S. (2005). Extracellular ATP induces cytokine expression and apoptosis through P2X7 receptor in murine mast cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 3880–3890.

Burnstock, G. (1976). Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience* *1*, 239–248.

Burnstock, G. (2006). Purinergic signalling--an overview. *Novartis Found. Symp.* *276*, 26–48; discussion 48–57, 275–281.

- Burnstock, G., and Di Virgilio, F. (2013). Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signal.* 9, 491–540.
- Cairns, R.A., Harris, I.S., and Mak, T.W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* 11, 85–95.
- Cannistra, S.A. (2004). Cancer of the ovary. *N. Engl. J. Med.* 351, 2519–2529.
- Chadet, S., Jelassi, B., Wannous, R., Angoulvant, D., Chevalier, S., Besson, P., and Roger, S. (2014). The activation of P2Y2 receptors increases MCF-7 breast cancer cells migration through the MEK-ERK1/2 signalling pathway. *Carcinogenesis* 35, 1238–1247.
- Chan, J.K., Cheung, M.K., Husain, A., Teng, N.N., West, D., Whittemore, A.S., Berek, J.S., and Osann, K. (2006). Patterns and progress in ovarian cancer over 14 years. *Obstet. Gynecol.* 108, 521–528.
- Choi, J.H., Ji, Y.G., and Lee, D.H. (2013). Uridine triphosphate increases proliferation of human cancerous pancreatic duct epithelial cells by activating P2Y2 receptor. *Pancreas* 42, 680–686.
- Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J.P., and Stojilkovic, S.S. (2011). Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol. Rev.* 63, 641–683.
- Colgin, D.C., and Murdoch, W.J. (1997). Evidence for a role of the ovarian surface epithelium in the ovulatory mechanism of the sheep: secretion of urokinase-type plasminogen activator. *Anim. Reprod. Sci.* 47, 197–204.
- Corriden, R., and Insel, P.A. (2010). Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation. *Sci. Signal.* 3, re1.
- Daniele, S., Zappelli, E., Natali, L., Martini, C., and Trincavelli, M.L. (2014). Modulation of A1 and A2B adenosine receptor activity: a new strategy to sensitise glioblastoma stem cells to chemotherapy. *Cell Death Dis.* 5, e1539.
- Davidson, B. (2001). Ovarian carcinoma and serous effusions. Changing views regarding tumor progression and review of current literature. *Anal. Cell. Pathol. J. Eur. Soc. Anal. Cell. Pathol.* 23, 107–128.
- Davis, F.M., Kenny, P.A., Soo, E.T.-L., van Denderen, B.J.W., Thompson, E.W., Cabot, P.J., Parat, M.-O., Roberts-Thomson, S.J., and Monteith, G.R. (2011). Remodeling of purinergic receptor-mediated Ca²⁺ signaling as a consequence of EGF-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. *PLoS One* 6, e23464.

Dickenson, J.M., and Hill, S.J. (1998). Potentiation of adenosine A1 receptor-mediated inositol phospholipid hydrolysis by tyrosine kinase inhibitors in CHO cells. *Br. J. Pharmacol.* *125*, 1049–1057.

Dubeau, L. (2008). The cell of origin of ovarian epithelial tumours. *Lancet Oncol.* *9*, 1191–1197.

Erben, P., Iorio, P., Seyer, P., and Weisman, G.A. (2006). P2 receptors: intracellular signaling. *Physiol. Rev.* *86*, 552–562.

Eun, S.Y., Ko, Y.S., Park, S.W., Chang, K.C., and Kim, H.J. (2015). IL-1 β enhances vascular smooth muscle cell proliferation and migration via P2Y2 receptor-mediated RAGE expression and HMGB1 release. *Vascul. Pharmacol.* *72*, 108–117.

Feoktistov, I., Goldstein, A.E., and Biaggioni, I. (1999). Role of p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated protein kinase in adenosine A2B receptor-mediated interleukin-8 production in human mast cells. *Mol. Pharmacol.* *55*, 726–734.

Ferreira, R., and Schlichter, L.C. (2013). Selective activation of KCa3.1 and CRAC channels by P2Y2 receptors promotes Ca(2+) signaling, store refilling and migration of rat microglial cells. *PloS One* *8*, e62345.

Filippov, A.K., Simon, J., Barnard, E.A., and Brown, D.A. (2003). Coupling of the nucleotide P2Y4 receptor to neuronal ion channels. *Br. J. Pharmacol.* *138*, 400–406.

Fleming, J.S., Beaujié, C.R., Haviv, I., Chenevix-Trench, G., and Tan, O.L. (2006). Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: revisiting old hypotheses. *Mol. Cell. Endocrinol.* *247*, 4–21.

Folkins, A.K., Saleemuddin, A., Garrett, L.A., Garber, J.E., Muto, M.G., Tworoger, S.S., and Crum, C.P. (2009). Epidemiologic correlates of ovarian cortical inclusion cysts (CICs) support a dual precursor pathway to pelvic epithelial cancer. *Gynecol. Oncol.* *115*, 108–111.

Fredholm, B.B., IJzerman, A.P., Jacobson, K.A., Linden, J., and Müller, C.E. (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors—An Update. *Pharmacol. Rev.* *63*, 1–34.

Gendron, F.-P., Neary, J.T., Theiss, P.M., Sun, G.Y., Gonzalez, F.A., and Weisman, G.A. (2003). Mechanisms of P2X7 receptor-mediated ERK1/2

phosphorylation in human astrocytoma cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284, C571–C581.

Godde, N.J., Galea, R.C., Elsum, I.A., and Humbert, P.O. (2010). Cell polarity in motion: redefining mammary tissue organization through EMT and cell polarity transitions. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 15, 149–168.

Guan, X. (2015). Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm. Sin. B* 5, 402–418.

Hajiahmadi, S., Panjehpour, M., Aghaei, M., and Mousavi, S. (2015a). Molecular expression of adenosine receptors in OVCAR-3, Caov-4 and SKOV-3 human ovarian cancer cell lines. *Res. Pharm. Sci.* 10, 43–51.

Hajiahmadi, S., Panjehpour, M., Aghaei, M., and Shabani, M. (2015b). Activation of A2b adenosine receptor regulates ovarian cancer cell growth: involvement of Bax/Bcl-2 and caspase-3. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 93, 321–329.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.

Harden, T.K., and Lazarowski, E.R. (1999). Release of ATP and UTP from astrocytoma cells. *Prog. Brain Res.* 120, 135–143.

Harden, T.K., Sesma, J.I., Fricks, I.P., and Lazarowski, E.R. (2010). Signalling and pharmacological properties of the P2Y receptor. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 199, 149–160.

Häusler, S.F., Del Barrio, I.M., Diessner, J., Stein, R.G., Strohschein, J., Hönig, A., Dietl, J., and Wischhusen, J. (2014). Anti-CD39 and anti-CD73 antibodies A1 and 7G2 improve targeted therapy in ovarian cancer by blocking adenosine-dependent immune evasion. *Am. J. Transl. Res.* 6, 129–139.

Häusler, S.F.M., Montalbán del Barrio, I., Strohschein, J., Anoop Chandran, P., Engel, J.B., Hönig, A., Ossadnik, M., Horn, E., Fischer, B., Krockenberger, M., et al. (2011). Ectonucleotidases CD39 and CD73 on OvCA cells are potent adenosine-generating enzymes responsible for adenosine receptor 2A-dependent suppression of T cell function and NK cell cytotoxicity. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 60, 1405–1418.

He, M.-L., Gonzalez-Iglesias, A.E., Tomic, M., and Stojilkovic, S.S. (2005). Release and extracellular metabolism of ATP by ecto-nucleotidase eNTPDase 1-3 in hypothalamic and pituitary cells. *Purinergic Signal*. 1, 135–144.

Höpfner, M., Maaser, K., Barthel, B., von Lampe, B., Hanski, C., Riecken, E.O., Zeitz, M., and Scherübl, H. (2001). Growth inhibition and apoptosis induced by P2Y2 receptors in human colorectal carcinoma cells: involvement of intracellular calcium and cyclic adenosine monophosphate. *Int. J. Colorectal Dis.* 16, 154–166.

Horváth, G., Göloncsér, F., Csölle, C., Király, K., Andó, R.D., Baranyi, M., Koványi, B., Máté, Z., Hoffmann, K., Algaier, I., et al. (2014). Central P2Y12 receptor blockade alleviates inflammatory and neuropathic pain and cytokine production in rodents. *Neurobiol. Dis.* 70, 162–178.

De Ita, M., Vargas, M.H., Carbajal, V., Ortiz-Quintero, B., López-López, C., Miranda-Morales, M., Barajas-López, C., and Montaña, L.M. (2016). ATP releases ATP or other nucleotides from human peripheral blood leukocytes through purinergic P2 receptors. *Life Sci.* 145, 85–92.

Jantaratnotai, N., and McLarnon, J.G. (2011). Calcium dependence of purinergic subtype P2Y₁ receptor modulation of C6 glioma cell migration. *Neurosci. Lett.* 497, 80–84.

Jin, D., Fan, J., Wang, L., Thompson, L.F., Liu, A., Daniel, B.J., Shin, T., Curiel, T.J., and Zhang, B. (2010). CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression. *Cancer Res.* 70, 2245–2255.

Jin, H., Seo, J., Eun, S.Y., Joo, Y.N., Park, S.W., Lee, J.H., Chang, K.C., and Kim, H.J. (2014a). P2Y2 R activation by nucleotides promotes skin wound-healing process. *Exp. Dermatol.* 23, 480–485.

Jin, H., Seo, J., Eun, S.Y., Joo, Y.N., Park, S.W., Lee, J.H., Chang, K.C., and Kim, H.J. (2014b). P2Y2 R activation by nucleotides promotes skin wound-healing process. *Exp. Dermatol.* 23, 480–485.

Jin, H., Eun, S.Y., Lee, J.S., Park, S.W., Lee, J.H., Chang, K.C., and Kim, H.J. (2014c). P2Y2 receptor activation by nucleotides released from highly metastatic breast cancer cells increases tumor growth and invasion via crosstalk with endothelial cells. *Breast Cancer Res. BCR* 16, R77.

Karst, A.M., and Drapkin, R. (2010). Ovarian cancer pathogenesis: a model in evolution. *J. Oncol.* 2010, 932371.

Kehasse, A., Rich, C.B., Lee, A., McComb, M.E., Costello, C.E., and Trinkaus-Randall, V. (2013). Epithelial wounds induce differential phosphorylation changes in response to purinergic and EGF receptor activation. *Am. J. Pathol.* *183*, 1841–1852.

Kim, ., and Dang, .V . (2006). a ncer’s molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res.* *66*, 8927–8930.

Komoszyński, M., and Wojtczak, A. (1996). Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* *1310*, 233–241.

Von Kügelgen, I. (2006). Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol. Ther.* *110*, 415–432.

Von Kügelgen, I., and Hoffmann, K. (2015). Pharmacology and structure of P2Y receptors. *Neuropharmacology*.

Kurman, R.J., and Shih, I.-M. (2016). The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *Am. J. Pathol.* *186*, 733–747.

Kurrey, N.K., K, A., and Bapat, S.A. (2005). Snail and Slug are major determinants of ovarian cancer invasiveness at the transcription level. *Gynecol. Oncol.* *97*, 155–165.

Lamarca, A., Gella, A., Martiñez, T., Segura, M., Figueiro-Silva, J., Grijota-Martinez, C., Trullas, R., and Casals, N. (2014). Uridine 5'-triphosphate promotes in vitro Schwannoma cell migration through matrix metalloproteinase-2 activation. *PLoS One* *9*, e98998.

Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 178–196.

Lengyel, E. (2010). Ovarian cancer development and metastasis. *Am. J. Pathol.* *177*, 1053–1064.

Lengyel, E., Burdette, J.E., Kenny, H.A., Matei, D., Pilrose, J., Haluska, P., Nephew, K.P., Hales, D.B., and Stack, M.S. (2014). Epithelial ovarian cancer experimental models. *Oncogene* *33*, 3619–3633.

Li, H., Xu, F., Li, S., Zhong, A., Meng, X., and Lai, M. (2016). The tumor microenvironment: An irreplaceable element of tumor budding and epithelial-mesenchymal transition-mediated cancer metastasis. *Cell Adhes. Migr.* 1–13.

- Li, W.-H., Qiu, Y., Zhang, H.-Q., Tian, X.-X., and Fang, W.-G. (2015). P2Y2 Receptor and EGFR Cooperate to Promote Prostate Cancer Cell Invasion via ERK1/2 Pathway. *PLoS ONE* 10.
- Lin, J.W., Sugimori, M., Llinás, R.R., McGuinness, T.L., and Greengard, P. (1990). Effects of synapsin I and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II on spontaneous neurotransmitter release in the squid giant synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 8257–8261.
- Liu, J., Liao, Z., Camden, J., Griffin, K.D., Garrad, R.C., Santiago-Pérez, L.I., González, F.A., Seye, C.I., Weisman, G.A., and Erb, L. (2004). Src homology 3 binding sites in the P2Y2 nucleotide receptor interact with Src and regulate activities of Src, proline-rich tyrosine kinase 2, and growth factor receptors. *J. Biol. Chem.* 279, 8212–8218.
- Lohman, A.W., Billaud, M., and Isakson, B.E. (2012). Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall. *Cardiovasc. Res.* 95, 269–280.
- Mahdi, S.H.A., Cheng, H., Li, J., and Feng, R. (2015). The effect of TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition on the expression of intracellular calcium-handling proteins in T47D and MCF-7 human breast cancer cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 583, 18–26.
- Marteau, F., Le Poul, E., Communi, D., Communi, D., Labouret, C., Savi, P., Boeynaems, J.-M., and Gonzalez, N.S. (2003). Pharmacological characterization of the human P2Y13 receptor. *Mol. Pharmacol.* 64, 104–112.
- Martínez-Ramírez, A.S., and Vázquez-Cuevas, F.G. (2015). Purinergic signaling in the ovary. *Mol. Reprod. Dev.* 82, 839–848.
- Martínez-Ramírez, A.S., Garay, E., García-Carrancá, A., and Vázquez-Cuevas, F.G. (2016). The P2RY2 Receptor Induces Carcinoma Cell Migration and EMT Through Cross-Talk With Epidermal Growth Factor Receptor. *J. Cell. Biochem.* 117, 1016–1026.
- Morris, G.E., Nelson, C.P., Brighton, P.J., Standen, N.B., Challiss, R.A.J., and Willets, J.M. (2012). Arrestins 2 and 3 differentially regulate ETA and P2Y2 receptor-mediated cell signaling and migration in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 302, C723–C734.
- Murdoch, W.J., and McDonnell, A.C. (2002). Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis. *Reprod. Camb. Engl.* 123, 743–750.
- Naora, H., and Montell, D.J. (2005). Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms. *Nat. Rev. Cancer* 5, 355–366.

- Narod, S. (2016). Can advanced-stage ovarian cancer be cured? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 13, 255–261.
- Neary, J.T., McCarthy, M., Kang, Y., and Zuniga, S. (1998). Mitogenic signaling from P1 and P2 purinergic receptors to mitogen-activated protein kinase in human fetal astrocyte cultures. *Neurosci. Lett.* 242, 159–162.
- Nicholas, R.A., Watt, W.C., Lazarowski, E.R., Li, Q., and Harden, K. (1996). Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor. *Mol. Pharmacol.* 50, 224–229.
- Van Niekerk, C.C., Bulten, J., van Dijck, J.A.A.M., and Verbeek, A.L.M. (2011). Epithelial ovarian carcinoma types and the coexistence of ovarian tumor conditions. *ISRN Obstet. Gynecol.* 2011, 784919.
- Norambuena, A., Palma, F., Poblete, M.I., Donoso, M.V., Pardo, E., González, A., and Huidobro-Toro, J.P. (2010). UTP controls cell surface distribution and vasomotor activity of the human P2Y2 receptor through an epidermal growth factor receptor-transregulated mechanism. *J. Biol. Chem.* 285, 2940–2950.
- North, R.A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* 82, 1013–1067.
- Nylund, G., Hultman, L., Nordgren, S., and Delbro, D.S. (2007). P2Y2- and P2Y4 purinergic receptors are over-expressed in human colon cancer. *Auton. Autacoid Pharmacol.* 27, 79–84.
- Oh, H.K., Sin, J.-I., Choi, J., Park, S.H., Lee, T.S., and Choi, Y.S. (2012). Overexpression of CD73 in epithelial ovarian carcinoma is associated with better prognosis, lower stage, better differentiation and lower regulatory T cell infiltration. *J. Gynecol. Oncol.* 23, 274–281.
- Ohta, A., Gorelik, E., Prasad, S.J., Ronchese, F., Lukashev, D., Wong, M.K.K., Huang, X., Caldwell, S., Liu, K., Smith, P., et al. (2006). A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 13132–13137.
- Oury, C., Toth-Zsomboki, E., Vermylen, J., and Hoylaerts, M.F. (2002). P2X(1)-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 2 contributes to platelet secretion and aggregation induced by collagen. *Blood* 100, 2499–2505.
- Pala, A., Karpel-Massler, G., Kast, R.E., Wirtz, C.R., and Halatsch, M.-E. (2012). Epidermal to Mesenchymal Transition and Failure of EGFR-Targeted Therapy in Glioblastoma. *Cancers* 4, 523–530.

Pan, Y., and Huang, X. (2008). Epithelial ovarian cancer stem cells-a review. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 1, 260–266.

Panenka, W., Jijon, H., Herx, L.M., Armstrong, J.N., Feighan, D., Wei, T., Yong, V.W., Ransohoff, R.M., and MacVicar, B.A. (2001). P2X7-like receptor activation in astrocytes increases chemokine monocyte chemoattractant protein-1 expression via mitogen-activated protein kinase. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 7135–7142.

Pattabiraman, D.R., Bierie, B., Kober, K.I., Thiru, P., Krall, J.A., Zill, C., Reinhardt, F., Tam, W.L., and Weinberg, R.A. (2016). Activation of PKA leads to mesenchymal-to-epithelial transition and loss of tumor-initiating ability. *Science* 351, aad3680.

Pellegatti, P., Raffaghello, L., Bianchi, G., Piccardi, F., Pistoia, V., and Di Virgilio, F. (2008). Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS One* 3, e2599.

Peterson, T.S., Camden, J.M., Wang, Y., Seye, C.I., Wood, W.G., Sun, G.Y., Erb, L., Petris, M.J., and Weisman, G.A. (2010). P2Y2 nucleotide receptor-mediated responses in brain cells. *Mol. Neurobiol.* 41, 356–366.

rat, . (2015). F O's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: abridged republication. *J. Gynecol. Oncol.* 26, 87–89.

Qiu, Y., Li, W., Zhang, H., Liu, Y., Tian, X.-X., and Fang, W.-G. (2014). P2X7 Mediates ATP-Driven Invasiveness in Prostate Cancer Cells. *PLoS ONE* 9.

al-Rashida, M., and Iqbal, J. (2014). Therapeutic potentials of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase, ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase, ecto-5'-nucleotidase, and alkaline phosphatase inhibitors. *Med. Res. Rev.* 34, 703–743.

Ratchford, A.M., Baker, O.J., Camden, J.M., Rikka, S., Petris, M.J., Seye, C.I., Erb, L., and Weisman, G.A. (2010). P2Y2 nucleotide receptors mediate metalloprotease-dependent phosphorylation of epidermal growth factor receptor and ErbB3 in human salivary gland cells. *J. Biol. Chem.* 285, 7545–7555.

Regateiro, F.S., Chen, Y., Kendal, A.R., Hilbrands, R., Adams, E., Cobbold, S.P., Ma, J., Andersen, K.G., Betz, A.G., Zhang, M., et al. (2012). Foxp3 expression is required for the induction of therapeutic tissue tolerance. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 189, 3947–3956.

Roger, S., Jelassi, B., Couillin, I., Pelegrin, P., Besson, P., and Jiang, L.-H. (2015). Understanding the roles of the P2X7 receptor in solid tumour progression and therapeutic perspectives. *Biochim. Biophys. Acta* 1848, 2584–2602.

Samways, D.S.K., Li, Z., and Egan, T.M. (2014). Principles and properties of ion flow in P2X receptors. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 6.

Schafer, R., Sedehizade, F., Welte, T., and Reiser, G. (2003). ATP- and UTP-activated P2Y receptors differently regulate proliferation of human lung epithelial tumor cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 285, L376–L385.

Schulte, G., and Fredholm, B.B. (2000). Human adenosine A(1), A(2A), A(2B), and A(3) receptors expressed in Chinese hamster ovary cells all mediate the phosphorylation of extracellular-regulated kinase 1/2. *Mol. Pharmacol.* 58, 477–482.

Sexl, V., Mancusi, G., Höller, C., Gloria-Maercker, E., Schütz, W., and Freissmuth, M. (1997). Stimulation of the mitogen-activated protein kinase via the A2A-adenosine receptor in primary human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 272, 5792–5799.

Sheth, S., Brito, R., Mukherjea, D., Rybak, L.P., and Ramkumar, V. (2014). Adenosine receptors: expression, function and regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 2024–2052.

Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA. Cancer J. Clin.* 66, 7–30.

Soltoff, S.P., Avraham, H., Avraham, S., and Cantley, L.C. (1998). Activation of P2Y2 receptors by UTP and ATP stimulates mitogen-activated kinase activity through a pathway that involves related adhesion focal tyrosine kinase and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 273, 2653–2660.

Spychala, J. (2000). Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol. Ther.* 87, 161–173.

Stewart, T.A., Azimi, I., Thompson, E.W., Roberts-Thomson, S.J., and Monteith, G.R. (2015). A role for calcium in the regulation of ATP-binding cassette, sub-family C, member 3 (ABCC3) gene expression in a model of epidermal growth factor-mediated breast cancer epithelial-mesenchymal transition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 458, 509–514.

Suh-Burgmann, E., and Powell, C.B. (2007). Cytoreductive surgery for gynecologic malignancies--new standards of care. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 16, 667–682, x – xi.

Swanson, K.D., Reigh, C., and Landreth, G.E. (1998). ATP-stimulated activation of the mitogen-activated protein kinases through ionotropic P2X2 purinoreceptors in PC12 cells. Difference in purinoreceptor sensitivity in two PC12 cell lines. *J. Biol. Chem.* 273, 19965–19971.

Takeuchi, S., and Yano, S. (2014). Clinical significance of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: sensitivity and resistance. *Respir. Investig.* 52, 348–356.

Thiery, J.P., and Sleeman, J.P. (2006a). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 131–142.

Thiery, J.P., and Sleeman, J.P. (2006b). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 131–142.

Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871–890.

Turcotte, M., Spring, K., Pommey, S., Chouinard, G., Cousineau, I., George, J., Chen, G.M., Gendoo, D.M.A., Haibe-Kains, B., Karn, T., et al. (2015). CD73 is associated with poor prognosis in high-grade serous ovarian cancer. *Cancer Res.*

Vázquez-Cuevas, F.G., Cruz-Rico, A., Garay, E., García-Carrancá, A., Pérez-Montiel, D., Juárez, B., and Arellano, R.O. (2013). Differential expression of the P2X7 receptor in ovarian surface epithelium during the oestrous cycle in the mouse. *Reprod. Fertil. Dev.* 25, 971–984.

Vázquez-Cuevas, F.G., Martínez-Ramírez, A.S., Robles-Martínez, L., Garay, E., García-Carrancá, A., Pérez-Montiel, D., Castañeda-García, C., and Arellano, R.O. (2014). Paracrine Stimulation of P2X7 Receptor by ATP Activates a Proliferative Pathway in Ovarian Carcinoma Cells. *J. Cell. Biochem.* 115, 1955–1966.

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

Waldo, G.L., and Harden, T.K. (2004). Agonist binding and Gq-stimulating activities of the purified human P2Y1 receptor. *Mol. Pharmacol.* 65, 426–436.

Warburg, O. (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269–270.

Weekes, C.D., and Winn, R.A. (2011). The Many Faces of Wnt and Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Oncogenesis. *Cancers* 3, 3676–3686.

White, P.J., Webb, T.E., and Boarder, M.R. (2003). Characterization of a Ca²⁺ response to both UTP and ATP at human P2Y₁₁ receptors: evidence for agonist-specific signaling. *Mol. Pharmacol.* 63, 1356–1363.

Whittemore, A.S. (1994). Characteristics relating to ovarian cancer risk: implications for prevention and detection. *Gynecol. Oncol.* 55, S15–S19.

Wiedon, A., Tölle, M., Bastine, J., Schuchardt, M., Huang, T., Jankowski, V., Jankowski, J., Zidek, W., and van der Giet, M. (2012). Uridine adenosine tetraphosphate (Up4A) is a strong inducer of smooth muscle cell migration via activation of the P2Y₂ receptor and cross-communication to the PDGF receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 1035–1040.

Wittmann, T., Bokoch, G.M., and Waterman-Storer, C.M. (2003). Regulation of leading edge microtubule and actin dynamics downstream of Rac1. *J. Cell Biol.* 161, 845–851.

Wong, A.S.T., and Leung, P.C.K. (2007). Role of endocrine and growth factors on the ovarian surface epithelium. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 33, 3–16.

Xie, R., Xu, J., Wen, G., Jin, H., Liu, X., Yang, Y., Ji, B., Jiang, Y., Song, P., Dong, H., et al. (2014). The P2Y₂ nucleotide receptor mediates the proliferation and migration of human hepatocellular carcinoma cells induced by ATP. *J. Biol. Chem.* 289, 19137–19149.

Yang, G., Zhang, S., Zhang, Y., Zhou, Q., Peng, S., Zhang, T., Yang, C., Zhu, Z., and Zhang, F. (2014). The inhibitory effects of extracellular ATP on the growth of nasopharyngeal carcinoma cells via P2Y₂ receptor and osteopontin. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* 33, 53.

Zhang, J., Yao, H., Song, G., Liao, X., Xian, Y., and Li, W. (2015). Regulation of epithelial-mesenchymal transition by tumor-associated macrophages in cancer. *Am. J. Transl. Res.* 7, 1699–1711.

Abreviaturas

ACE	Antígeno carcino embrionario
ACTB	Beta actina
ADA	Adenosina deaminasa
Ado	Adenosina
ADORA	Receptores a adenosina
ADP	Adenosina difosfato
AG	AG1478
AG1478	N-(3-Clorofenil)-6,7-dimetoxi-4-quinazolinamina
AKT	Proteína cinasa B
ALPL	Fosfatasa alcalina ubicua
ALPP	Fosfatasa alcalina placentaria
AMP	Adenosina monofosfato
AP	Fosfatasa alcalina
APCP	Adenosina 5'-(α - β -metilen)difosfato
Apy	Apirasa
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
CALM	Cinasa de calcio calmodulina
cAMP	adenosina monofosfato cíclico
Canales ABC	Canales con casete de unión a ATP
CNT	Proteínas transportadoras concentradoras
DAG	Diacilglicerol
DAPI	(4',6-diamino-2-fenilindol)
DPR	Dipiridamola
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
EMT	Transición epitelio mesénquima
ENPP	Ectofosfodiesterasa/nucleotido fosfohidrolasa
ENT	Proteínas transportadoras equilibradoras
ENTPD	Ectonucleosido trifosfato difosfohidrolasa
ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
HE4	Proteína del epidídimo humana
HGF	Factor de crecimiento hepático
HIF	Factor inducido por hipoxia
IL-1 β	Interleucina 1 beta

IP	Inmunoprecipitación
IP3	Inositol trifosfato
JNK	Cinasa c-jun N-terminal
MAPKs	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MET	Transición mesénquima epitelio
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MTS	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2-tetrazolio
NT5E	Ecto 5'-nucleotidasa
OSE	Epitelio ovárico superficial
P2RY2-KD	Células carentes de expresión del receptor P2RY2
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PDGFR	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
Pi	Fosfato inorgánico
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasas
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PO	Proyección ortogonal
PP2	4-amino-5-(4-cloropenil)-7-(t-butil)pirazol
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa
S	Serina
SFB	Suero fetal bovino
SH3	Dominio homólogo a Src-3
shRNA	Ácido ribonucleico de horquilla corta
T	Treonina
TAC	Tomografía abdominal contrastada
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TM	Región transmembranal
TMZ	Temozolomida
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
TRK	Receptores con actividad de cinasa de tirosina intrínseca
TUBB	Beta tubulina
UDP	Uridina difosfato
UTP	Uridina trifosfato
WB	Western blot
Wort	Wortmanina
Y	Tirosina

Artículos publicados

The P2RY2 Receptor Induces Carcinoma Cell Migration and EMT Through Cross-Talk With Epidermal Growth Factor Receptor

A.S. Martínez-Ramírez,¹ E. Garay,¹ A. García-Carrancá,^{2,3} and F.G. Vázquez-Cuevas^{1*}

¹Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla 3001, Juriquilla Querétaro, CP 76230, Querétaro, Mexico

²Laboratorio de Virus y Cáncer, Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. San Fernando #22, Colonia Sección XVI, Tlalpan, CP 14080, Mexico

³División de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, Secretaría de Salud, México. Av. San Fernando #22, Colonia Sección XVI, Tlalpan, CP 14080, Mexico

ABSTRACT

Extracellular nucleotides are signaling elements present in the tumor microenvironment; however, their role in tumor growth is not completely understood. In the present study, we asked whether nucleotides regulate cell migration in ovarian carcinoma-derived cells. We observed that 100 μ M UTP induced migration in SKOV-3 cells (1.57 \pm 0.08 fold over basal), and RT-PCR showed expression of transcripts for the P2RY2 and P2RY4 receptors. Knockdown of P2RY2 expression in SKOV-3 cells (P2RY2-KD) abolished the UTP-induced migration. The mechanism activated by UTP to induce migration involves transactivation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) since we observed that the EGFR kinase inhibitor AG1478 and the PI3K inhibitor Wortmannin inhibit this response (to 0.76 \pm 0.23 and 0.46 \pm 0.14 relative to the control, respectively). In agreement with these observations, UTP was able to modify the phosphorylation state of the EGFR; likewise, the induction of ERK1/2 phosphorylation promoted by UTP was abolished by a 30–60 min treatment with AG1478. Our data also suggested that the enhanced cell migration involves the epithelium to mesenchymal transition (EMT) process, since a 12 h stimulation of SKOV-3 cells with 100 μ M UTP showed an increase in vimentin and SNAIL protein levels (459.8 \pm 132.4% over basal for SNAIL). Interestingly, treatment with apyrase (10 U/mL) reduces the migration of control cells and induces a considerable enrichment of E-cadherin in the cell–cell contacts, favoring an epithelial phenotype and strongly suggesting that the nucleotides released by tumor cells and acting through the P2RY2 receptor are potential regulators of invasiveness. *J. Cell. Biochem.* 117: 1016–1026, 2016. © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: P2RY2 RECEPTOR; OVARIAN CARCINOMA; EGFR TRANSACTIVATION; PURINERGIC SIGNALING; CELL MIGRATION; EMT

Epithelial ovarian cancer patients have the highest mortality rate among the gynecological diseases in the developed countries [Lowe et al., 2013], and their mortality is significantly raised by the ability of tumor cells to disseminate throughout the peritoneal cavity and promote secondary tumors in various organs [Munkarah et al., 1997]. Thus, it is relevant to identify the pathways regulating cell motility and invasiveness in order to understand the mechanisms implicated in the lethality caused by this disease.

It is known that ATP is released from cells in response to various stimuli, and it has an important role mediating autocrine and

paracrine signaling events [Corriden and Insel, 2010]. In the cancer context, there is evidence showing that cancer cells have metabolic deregulation, leading to an increase in ATP production [Warburg, 1956; Teicher et al., 2012]; thus, the ATP level at the tumor interstitium is high enough to activate P2 receptors [Pellegatti et al., 2008].

ATP and other nucleotides can activate two families of purinergic receptors, called the P2RX and P2RY receptors; P2RY are G protein-coupled receptors (GPCR) that induce a signaling cascade through different second messengers depending on the heterotrimeric G

Conflicts of interest: The authors declare no conflict of interest.

Grant sponsor: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) México; Grant number: 166725; Grant sponsor: PAPIIT-DGAPA-UNAM México; Grant number: IN205114.

*Correspondence to: Dr. Francisco Gabriel Vázquez-Cuevas, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla 3001, Juriquilla Querétaro, C.P. 76230, Mexico.

E-mail: fvazquez@comunidad.unam.mx; fvazquezc132005@yahoo.com.mx

Manuscript Received: 28 July 2015; Manuscript Accepted: 5 October 2015

Accepted manuscript online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 7 October 2015

DOI 10.1002/jcb.25390 • © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

protein associated with them, and they are activated by purines and pyrimidines. The human P2RY2 receptor is activated with similar potency by ATP and UTP, and is preferably coupled to the G_{αq} protein, which leads to activation of phospholipase C (PLC) and to an increase of the second messengers diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5 trisphosphate (IP₃), activating protein kinase C (PRKC) and IP₃-dependent Ca²⁺ channels on the endoplasmic reticulum membrane, respectively [Burnstock, 2007; Weisman et al., 2012].

Recent studies in different models, including physiological and pathophysiological processes, have demonstrated the participation of the P2RY2 receptor in inducing migration or the EMT process [Li et al., 2013; Jin et al., 2014a; Lamarca et al., 2014; Xie et al., 2014]. There is evidence suggesting that epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation must be important for P2RY2 receptor-induced migration, e.g., it has been reported that transactivation of the EGFR by the P2RY2 receptor in human salivary gland cells requires the activity of metalloproteinases [Ratchford et al., 2010]; in agreement with this, in epithelial cells, P2RY2 receptor stimulation induced the phosphorylation of tyrosines of the EGFR [Kehasse et al., 2013].

Epidermal growth factor (EGF) activates the EGFR, a family of membrane receptors with intrinsic tyrosine kinase activity. Accumulated evidence supports the idea that EGF-EGFR-mediated signaling participates in the progression and invasiveness of different types of carcinoma [Normanno et al., 2006]. In ovarian carcinoma cells, EGFR activation induces a migratory phenotype that involves the EMT process [Thiery and Sleeman, 2006]; this is an important observation because the EMT is a mechanism involved in metastasis [Kong et al., 2011]. EGFR activity in ovarian carcinoma-derived cells has also been related to the regulation of proliferation [Anderson et al., 2001]. Broad evidence has shown that the EGFR is transactivated by other receptors, and it is well established that this phenomenon occurs in cancer models [Bhola and Grandis, 2008]. Specifically in ovarian carcinoma, it has been demonstrated that the EGFR is transactivated by the chemokine CXCL1 [Bolitho et al., 2010] and by the membrane estrogen receptor GPER1 [Fujiwara et al., 2012], both modulating cell proliferation, and by interleukin 6 (IL-6) which regulates the EMT process [Colomiere et al., 2009].

Here, we show evidence suggesting that an EGFR transactivation pathway activated by the P2RY2 receptor is involved in migration and in inducing the EMT process in ovarian carcinoma-derived cells, SKOV-3. These observations are relevant for a better understanding of the mechanisms leading to tumor invasiveness.

MATERIALS AND METHODS

MATERIALS

SKOV-3 cells (HTB-77) were from the American Type Culture Collection (ATCC). RPMI culture medium, bovine fetal serum (FBS), antibiotic-antimycotic mixture and trypsin were from Life Technologies (Carlsbad, CA). Puromycin was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). UTP, EGF, wortmannin, and all salts were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) and AG1478 was from TOCRIS bioscience (Bristol, UK).

MIGRATION ASSAY

Transwell assays were performed using 12-well plates containing 8 μm polyethylene hanging cell culture inserts (Millipore, Billerica, MA). Briefly, 3 × 10⁴ cells were seeded at the apical side of the chamber. The basolateral side was filled with conditioned medium. After 16 h of incubation, cells attached on the lower face of the inserts were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min, permeabilized, and stained with hematoxylin. The samples were observed under a light microscope, and pictures were taken and analyzed using ImageJ Software (NIH, Bethesda, MD).

CELL VIABILITY ASSAY

The mitochondrial activity of the whole culture was measured by using the [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium salt reduction method (MTS assay) supplied in the commercial kit *Cell Titer 96* (Promega, Fitchburg, WI). For this, SKOV-3 cells were cultured in 96-well plates in RPMI medium with 10% FBS; 24 h later, the medium was changed to serum-free RPMI, the indicated treatment was added, and the cultures were incubated for the indicated time. The MTS assay was carried out as described by the manufacturer. Absorbance at 495 nm was measured; results were expressed as fold increase of absorbance relative to control cells.

REVERSE TRANSCRIPTION AND POLYMERASE CHAIN REACTION

Reverse transcription using total RNA from SKOV-3 cells was performed with the Reverse Transcription System kit (Promega), following the manufacturer's protocol. The polymerase chain reaction was carried out to amplify the transcripts of *ACTB*, *GAPDH*, *P2RY2*, *P2RY4*, *SNAIL*, and *TWIST*, using the cDNA as template. The PCR programs started at 95°C for 3 min and finished at 72°C for 1 min. The amplification cycles consisted in 30 s at 95°C, 40 s at the specific annealing temperature for each primer set, and 45 s at 72°C.

The sequences of the oligonucleotides, the annealing temperatures, and the number of PCR cycles used were as follows: for *ACTB*, 5'-GGGTCAGAAGGATTCTATG-3', reverse 5'-GGTCTCAAACATGATCTGGG-3', annealing temperature 55°C, 25 cycles; for *P2RY2*, forward 5'-TCC TGTTCCCGCAGAGTTC-3' and reverse 5'-CACCTGACCAGGGCTTTCAT-3', annealing temperature 58°C, 35 cycles; *P2RY4*, forward 5'-CTGC AAGTTCGTCGCTTTC-3' and reverse 5'-CAAAGAACAGGTTGGG-CACG-3', annealing temperature 58°C, 35 cycles; *SNAIL*, forward 5'-TTCTTCTGCGCTACTGCTGCG-3' and reverse 5'-GGGCAGGTATGGA-GAGGA-3', annealing temperature 60°C, 33 cycles; *TWIST*, forward 5'-GAGTCCGAGTCTTACGAGG-3' and reverse 5'-CTGCCGCTGGGAATCACT-3', annealing temperature 60°C, 33 cycles; all the primers were synthesized by Sigma-Aldrich except GAPDH primers, which were from Thermo Scientific (Waltham, MA), forward 5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTG-3' and reverse 5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3' annealing temperature 60°C, 35 cycles.

IMMUNOFLUORESCENCE LABELING

The labeling of P2RY2, P2RY4, Vimentin, E-cadherin, and SNAIL by immunofluorescence was carried out according to protocols described in previous work [Vázquez-Cuevas et al., 2013]; the primary antibodies (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) were used at a dilution of 1:100, and the secondary antibody was

anti-rabbit IgG coupled to Alexafluor 488 (Life Technologies) diluted 1:100. The samples were analyzed by confocal microscopy (Zeiss Axiovert 200 LSM 510 Meta-Multiphotonic).

WESTERN BLOT

SKOV-3 cells were plated on 12-well dishes with RPMI medium supplemented with 10% FBS and antibiotic-antimycotic (streptomycin, penicillin and amphotericin B, Life Technologies). Semi-confluent cultures were starved for 24 h by incubation in FBS-free medium, and then treated according to each experimental protocol. Western blot was performed as described previously [Vázquez-Cuevas et al., 2013]. Primary antibodies against: Phosphorylated-ERK (P-ERK), total-ERK (T-ERK), phosphorylated-EGFR (P-EGFR), total-EGFR (T-EGFR), Vimentin, E-Cadherin, SNAIL, and ACTB (Cell Signaling Technologies) were added at a 1:1000 dilution and incubated overnight at 4°C. The secondary antibody, HRP-conjugated goat anti-rabbit (Life Technologies) was used at a dilution of 1:10,000. The immunoreactive proteins were detected by chemiluminescence with the Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific). Images were analyzed using ImageJ Software (NIH). When necessary, membranes were stripped by incubating them in stripping solution (50 mM Tris, pH 6.8, 100 mM β -mercaptoethanol, and 2% SDS) before being retested.

P2RY2 GENE SILENCING

Gene knockdown was performed by transfecting a pool of three lentiviral vector plasmids each encoding target-specific shRNAs designed to knock down gene expression of the human P2RY2 receptor (sc-42579-SH, Santa Cruz Biotechnology), according to the manufacturer's protocol. The transfected cells were selected using RPMI medium containing 10% FBS and 3 μ g/mL puromycin. Gene silencing efficiency was determined by RT-PCR and Western blot. The control plasmid containing the open reading frame of green fluorescent protein (copGFP) was used to follow the transfection efficiency; as control, a plasmid coding for an shRNA with random sequence was used (random shRNA). Single-cell-derived clones were obtained by dilution.

IMMUNOPRECIPITATION

Cells were scraped in 0.5% TNTE containing: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, and protease inhibitor cocktail tablets (Roche, Mannheim, Germany). The cell lysate was centrifuged for 5 min at 10,000 rpm at 4°C, the soluble fraction was incubated overnight with 3 μ L of anti-SNAIL antibody (Cell Signaling Technologies), and then 50 μ L of protein G agarose was added to the lysate and incubated for 1 h at room temperature. Samples were centrifuged for 1 min at 14,000 rpm at 4°C; the agarose beads were washed 3 times with TNTE containing 1% Triton X-100 and protease inhibitor cocktail, and then prepared for electrophoresis and analyzed by Western blot.

RESULTS

UTP INDUCES AN INCREASE IN SKOV-3 CELL MIGRATION

An enhanced ability for migration and invasion is an important feature of metastatic cells. In order to analyze the effect of nucleotides (UTP and ATP) on the migratory ability of SKOV-3 cells, a carcinoma-derived line with epithelial morphology, we performed a transwell assay (Fig. 1a,b). A stimulus with 100 μ M UTP induced an increase of SKOV-3 cell migration (1.575 \pm 0.085 fold over basal); however, ATP or UDP, at the same concentration, were unable to induce similar effects, suggesting that this response is dependent on P2RY2 and/or P2RY4 receptors. Moreover, the treatment with apyrase, an ectonucleotidase that degrades purine and pyrimidine nucleotides, and their dephosphorylated metabolites, showed a significant reduction of cell migration compared with the basal level (Fig. 1a,b), suggesting that nucleotides released by the SKOV-3 cells into their own culture medium regulate their migratory ability, likely by acting through purinergic receptors in a paracrine way. This notion is supported by a report showing that SKOV-3 cells release nucleotides in response to a mechanical stimulus [Vázquez-Cuevas et al., 2014].

Similar results were obtained by the scratch assay. In these experiments 100 μ M UTP induced a significant increase

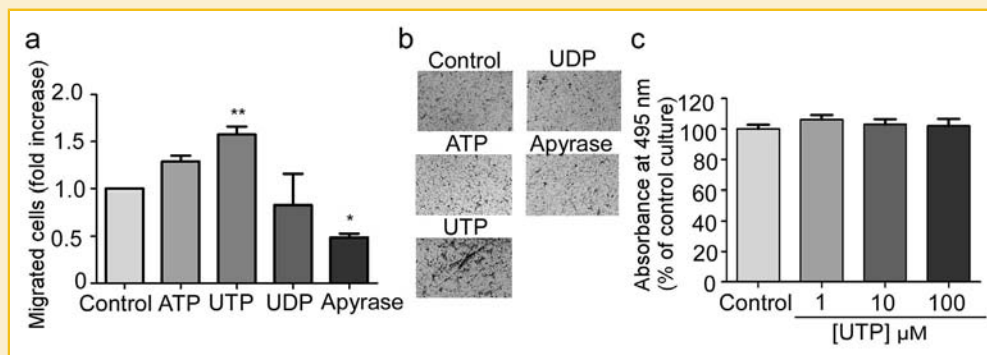


Fig. 1. The migratory ability of SKOV-3 cells is modified by stimulation with exogenous nucleotides or by the addition of apyrase. (a) Fold increase in number of migrated cells normalized against the control group, with 12 h of stimulation with ATP, UTP, or UDP (all at 100 μ M) or apyrase (10 U/mL); analyzed by transwell assay. (b) Representative pictures for transwell assay with each treatment at the same concentration. (c) Cell proliferation for SKOV-3 cells incubated with different concentrations of UTP for 24 h and measured by the MTS assay; absorbance at 495 nm was measured and is expressed as percentage of control level. ** $P < 0.01$ basal versus UTP, * $P < 0.05$ basal versus apyrase.

($19.91 \pm 1.33\%$ damaged area) in SKOV-3 invasion; $100 \mu\text{M}$ ATP did not induce increased invasion, and apyrase (10 U/mL) induced a reduced level of migration ($8.50 \pm 1.07\%$ damaged area) compared with the control level ($12.50 \pm 0.89\%$ damaged area) (Fig. S1a,b).

To exclude the possibility that the observed effects on migration are confused with induction of cell proliferation, we tested the effect of UTP on proliferation using the MTS assay for cell viability as described in the methods section. Incubation with 1, 10, or $100 \mu\text{M}$ UTP for 24 h did not increase the cell viability, indicating no effect on proliferation (Fig. 1c).

SKOV-3 CELLS EXPRESS P2RY2 AND P2RY4 RECEPTORS

In order to identify the receptor mediating the effects of UTP on cell migration in the SKOV-3 cells, a RT-PCR analysis was performed; we detected amplicons for P2RY2 and P2RY4, confirming the presence of UTP-sensitive receptors in SKOV-3 cells (Fig. 2a). To confirm our RT-PCR results we observed the expression of P2RY2 and P2RY4 receptors by immunofluorescence and confocal microscopy. Figure 2b shows the presence of both receptors in SKOV-3 cells; the orthogonal projection (OP) shows that P2RY2 or P2RY4 (green signal) are expressed in a region above the nucleus (blue signal), strongly suggesting that both receptors are located in the plasma membrane.

UTP-INDUCED MIGRATION IN SKOV-3 CELLS DEPENDS ON EXPRESSION OF THE P2RY2 RECEPTOR

We have shown an important effect on cell migration induced by $100 \mu\text{M}$ UTP. As we know, the main pharmacological targets of UTP are the P2RY2 and P2RY4 receptors. The pharmacological tools available that target these receptors cannot discriminate among the responses they induce [Von Kügelgen, 2006].

Some reports have shown that the P2RY2 receptor induced migration in other models [Li et al., 2013; Jin et al., 2014a; Lamarca

et al., 2014; Xie et al., 2014]; based on this evidence we knocked down P2RY2 receptor expression in SKOV-3 cells, as described in the methods section, to determine if this receptor is responsible for the UTP-dependent effects in these cells. Figure 3a (upper panel) shows the RT-PCR analysis of the P2RY2 receptor transcript in SKOV-3 cells with either P2RY2-KD or transfected with random shRNA. There was a significant decrease of P2RY2 mRNA levels (73.38%) in the knockdown cell line, while it is clearly present in the control and random shRNA cells. Also we tested by western blot for the presence of P2RY2 protein in SKOV-3 cells, in cells transfected with random shRNA or in P2RY2-KD cells, and found that protein expression was abolished in P2RY2-KD cells as shown in Figure 3a (lower panel).

UTP did not induce increased migration in P2RY2-KD cells analyzed by transwell assay; however, UTP did induce a significant increase in the migration of cells transfected with random shRNA (1.45 ± 0.14 fold over control cells) (Fig. 3b). This result strongly suggested that the P2RY2 receptor participates in the migration response induced by UTP in SKOV-3 cells.

UTP-INDUCED MIGRATION INVOLVES EGFR TRANSACTIVATION

It is well known that G-protein coupled receptors (GPCR) are able to transactivate the EGFR [Vázquez-Prado et al., 2003]; moreover, there is evidence showing that the P2RY2 receptor mediates activation of the EGFR by a pathway that involves the processing of EGF by metalloproteases [Ratchford et al., 2010].

There is a relationship between some pathways such as MAPK-ERK and PI3K, which are downstream components from the EGFR signal, and the induction of migration in cancer models. Several studies have shown that EGFR inhibitors can reduce migration, and these inhibitors are used as chemotherapeutic drugs [Fichter et al., 2014].

In order to explore the mechanisms involved in the UTP-dependent increase of migration in SKOV-3 cells, we evaluated the effect of EGFR and PI3K inhibitors on the UTP-induced migratory response by

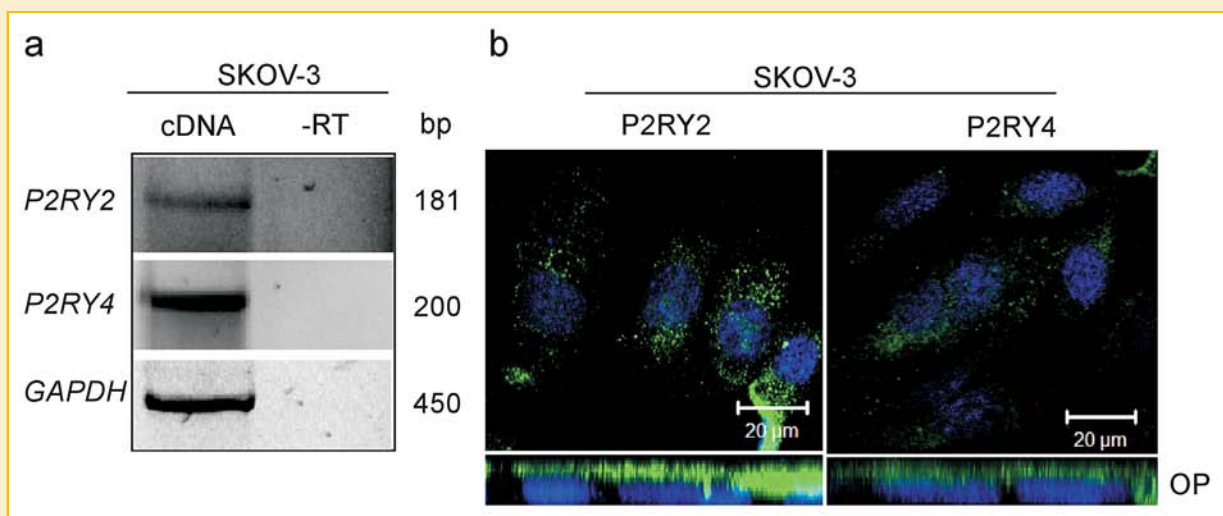


Fig. 2. Expression of P2RY receptors in SKOV-3 cells. (a) Gel analysis of amplicons of the P2RY2 and P2RY4 transcripts obtained by reverse transcription and polymerase chain reaction with specific oligonucleotides; a control of the reverse transcription reaction was included (-RT), and as housekeeping transcript GAPDH was amplified. (b) Immunofluorescence label of P2RY2 and P2RY4 receptors detected with a secondary antibody coupled to Alexafluor 488 (green signal); the nucleus was stained with DAPI (blue signal). Orthogonal projections of confocal images are shown (OP).

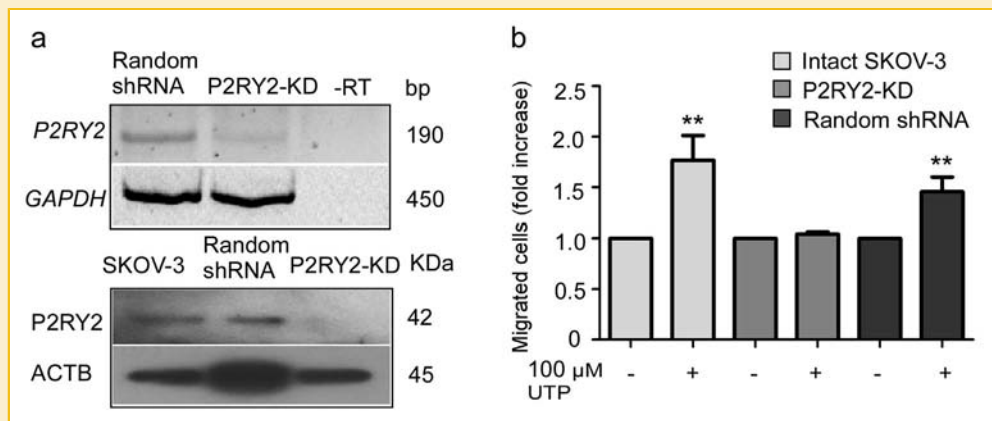


Fig. 3. Knockdown of P2RY2 receptor abolishes the UTP-dependent increase of cell migration in SKOV-3 cells. (a) Upper panel shows the gel analysis of the amplicon of the P2RY2 transcript obtained by reverse transcription and polymerase chain reaction in SKOV-3 cells, either transfected with a shRNA control (random shRNA) or P2RY2 knockdown (P2RY2-KD); GAPDH transcript was amplified as positive control as a control of the reverse transcription reaction is included (-RT). In the lower panel P2RY2 was detected by Western blot in homogenates of SKOV-3 cells, either intact, P2RY2-KD or transfected with a random shRNA; ACTB was detected as control. (b) Cell migration levels for: intact, P2RY2-KD, or random shRNA-transfected SKOV-3 cells, estimated by transwell assay.

incubating the cells for 20 min with 1 μM AG1478, a potent inhibitor of the tyrosine kinase activity of EGFR, or with 100 nM wortmannin, an inhibitor of PI3K. When cells were incubated with UTP they showed a significant increase of migration (2.05 ± 0.22 fold relative to the control), as observed previously. Preincubation with 1 μM AG1478 or 100 nM wortmannin completely prevented the UTP-induced migration (0.77 ± 0.32 and 0.47 ± 0.20 fold of control, respectively) (Fig. 4). These results suggest that both activated EGFR and the P13K/AKT pathway are involved in regulating the cellular migration induced by P2RY2 receptor activation.

To demonstrate that P2RY2 receptor activity modulates the signal transduction pathway dependent on the EGFR, we analyzed the regulation of EGFR phosphorylation when SKOV-3 cells were

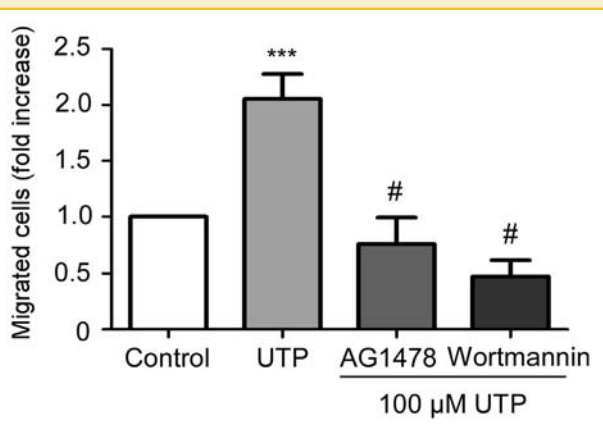


Fig. 4. UTP-promoted effects on SKOV-3 cell migration depend on EGFR pathway activity. Number of migrated cells, normalized against the control group, after incubation with 100 μM UTP alone or after a 20 min preincubation with 1 μM AG1478 or 100 nM Wortmannin. *** $P < 0.001$ versus Control, # $P < 0.001$ versus UTP.

stimulated by UTP. Incubation with 100 μM UTP for different times promoted an increase in phosphorylated EGFR (P-EGFR) after 5 min ($139 \pm 19.68\%$ of basal) of stimulation that was sustained for 120 min ($169.9 \pm 16.21\%$ of basal) (Fig. 5a), indicating activation of the tyrosine kinase activity of the protein.

The extracellular signal-regulated kinases (ERK) are important effectors of EGFR; these kinases are involved in regulating the cell cycle, and their activity promotes cell proliferation [Chambard et al., 2007]. To analyze the relation between P2RY2 activation and EGFR activity, we measured P-ERK levels after addition of 100 μM UTP for 60 min. The results showed a biphasic pattern of P-ERK accumulation: a major peak was detected at 5 min of incubation ($286.56 \pm 47.8\%$ of basal) that decreased by 10 min; a second increase was observed at 60 min ($272.5 \pm 56.2\%$ of basal, five independent experiments). To inquire about a role for EGFR in this response, cells were incubated for 20 min with 100 nM AG1478 before the stimulus with UTP; the inhibitor did not affect the increase at 5 min, but it completely blocked the increases at 60 min. This result suggests that two different mechanisms are involved in the UTP-mediated rise of P-ERK: first a transient event that does not depend on EGFR activation, and another event later (at 60 min) that depends on EGFR tyrosine kinase activity (Fig. 5b).

UTP INCREASES THE EXPRESSION OF EMT INDUCERS

The epithelial to mesenchymal transition is an important process mediating the differentiation of epithelial cells to acquire an invasive phenotype [Lamouille et al., 2014]. In prostate cancer it has been reported that the P2RY2 receptor is involved in regulating the expression of SNAIL and TWIST [Li et al., 2013], which are transcription factors that regulate the transcription of different EMT-related genes. For example, SNAIL down regulates E-cadherin expression, the main marker of the epithelial phenotype [Nieto, 2009].

To evaluate if the elevated cell migration induced by UTP involves the regulation of SNAIL and TWIST expression, we evaluated the

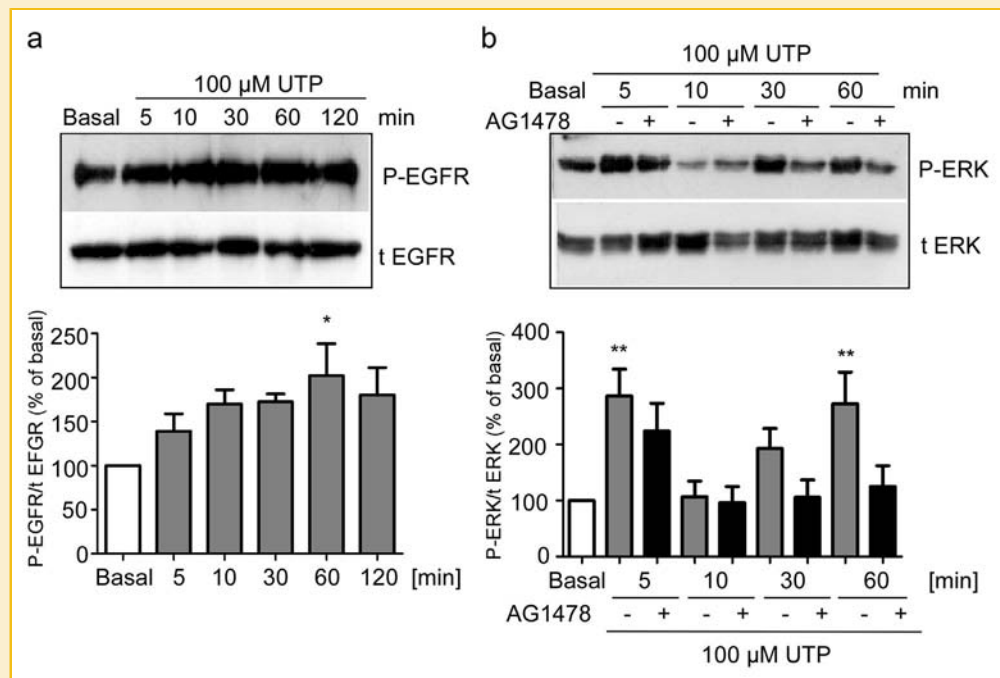


Fig. 5. UTP induces transactivation of the EGF receptor in SKOV-3 cells. Time course (5–120 min) of: (a) EGFR phosphorylation (P-EGFR) induced by 100 μ M UTP in SKOV-3 cells, or (b) Induction of ERK phosphorylation (P-ERK) mediated by stimulation with 100 μ M UTP alone or in presence of 100 nM AG1478. The graphs were constructed with data from three independent experiments, each in duplicate. * $P < 0.05$ versus Basal.

corresponding mRNAs by RT-PCR in SKOV-3 cells that were incubated with 100 μ M UTP for 2, 16, and 26 h. The results showed the presence of both mRNAs beginning at 16 h (Fig. 6a). Additionally, by immunoprecipitation and Western blot (Fig. 6b), an increase in SNAIL protein was detected in cells incubated with UTP for 12 h ($459.8 \pm 132.4\%$ of basal level, three independent determinations). EGF, which is known to be a potent EMT inducer [Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005], was used as positive control. EGF increased SNAIL expression 20 fold with respect to the basal level. Also, the UTP stimulus promoted the translocation of SNAIL protein into the cellular nucleus, compared against control conditions (Fig. 6c, yellow arrows). Together, this evidence suggests that UTP regulates EMT inducers.

UTP REGULATES EMT MARKERS

Two classical markers of EMT are E-cadherin, a marker of epithelial phenotype, and vimentin, a type III intermediate filament strongly expressed in mesenchymal cells with a role in the induction of the invasive and metastatic progression [Acloque et al., 2009]. We evaluated the expression patterns of these two proteins using immunofluorescence in SKOV-3 cells stimulated with 100 μ M UTP for 12 h.

Vimentin expression strongly increased over the time evaluated, in agreement with the increases in the cell migratory ability and SNAIL accumulation. The immunoreactivity was localized in the cytoplasm with the classical arrangement of filaments. The cells also showed extensions and the presence of filopodia, characteristics of mesenchymal cells. Preincubation of SKOV-3 cells with 1 μ M AG1478 before the stimulus with UTP blocked the increase in

vimentin expression (Fig. 7), consistent with the suggestion that the UTP-dependent effects on migration and EMT induction involve EGFR transactivation.

On the other hand, in non-stimulated SKOV-3 cells, E-cadherin was detected mainly in the cytoplasm but also in the cellular contacts; stimulation with UTP induced a reduction in E-cadherin expression. Interestingly, incubation with apyrase completely changed the E-cadherin localization pattern, shifting it to the cell–cell contacts, presumably to the adherent junctions, which indicates a predominantly epithelial phenotype. In addition, treating the cells with apyrase, an ectonucleotidase, induced a cuboidal morphology, and the absence of cellular extensions (Fig. 8). The expression pattern of E-cadherin in cells incubated with inactivated apyrase (heated for 15 min at 90°C) was similar to that of the control culture.

These results suggest a role of the P2RY2 receptor in mediating EMT, and a role for nucleotides secreted by SKOV-3 cells in inducing a mesenchymal phenotype. The latter role is supported by the low migration observed when cells were incubated with the ectonucleotidase (Fig. 1a).

DISCUSSION

Ovarian carcinomas cause a high mortality rate, and one of the underlying reasons is that patients frequently have disseminated metastases at the time of diagnosis; the mechanisms regulating the migratory capability are important to understand the high invasiveness of this disease.

Tumor growth and metastasis are processes highly modulated by the tumor microenvironment; it has been demonstrated that ATP is

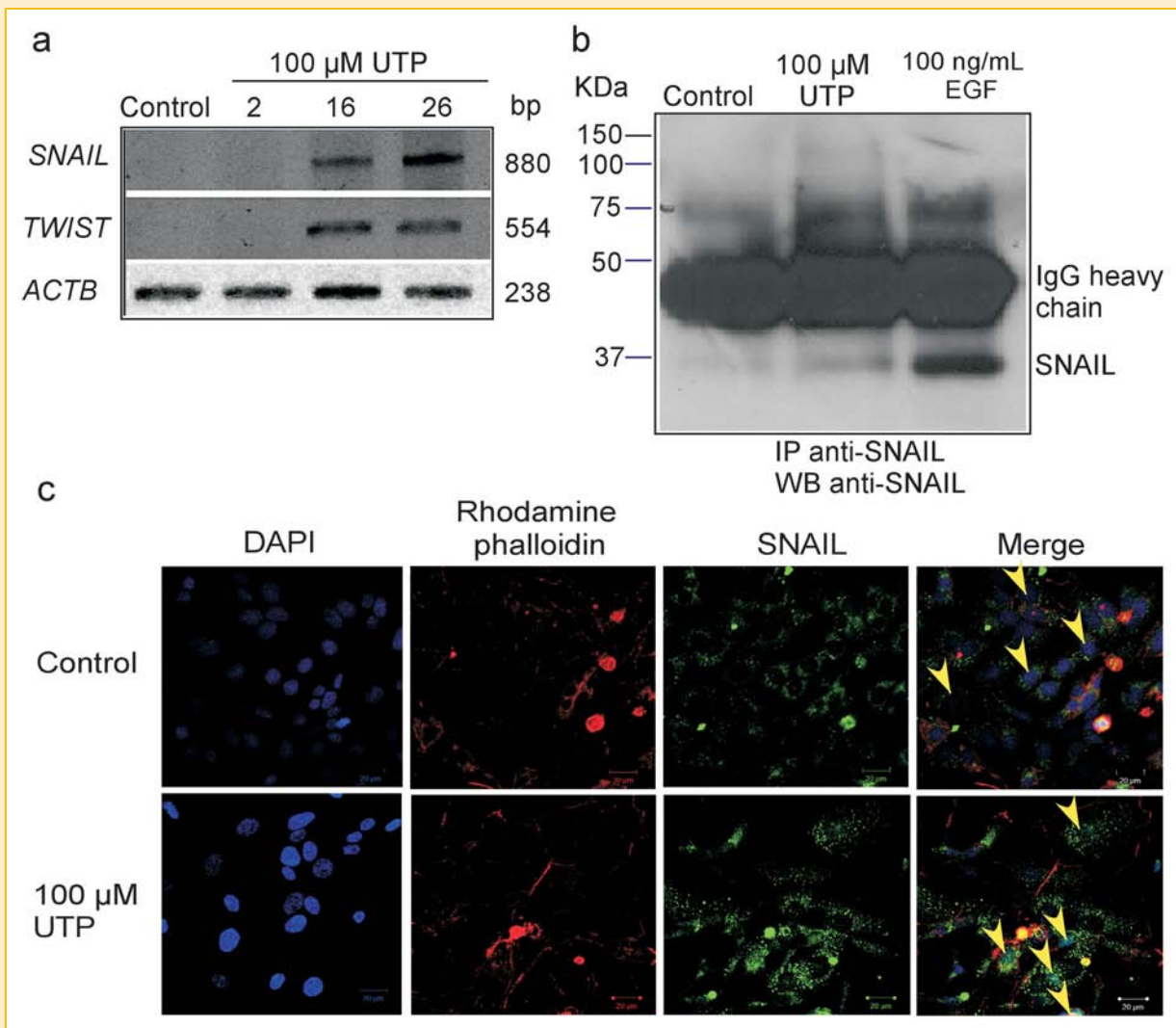


Fig. 6. P2RY2 receptor activation induces an increase in transcription factors for EMT inducers. (a) SKOV-3 cells were stimulated with 100 μ M UTP for 16 or 26 h, and the transcripts of *SNAIL* and *TWIST* were analyzed by RT-PCR and gel electrophoresis; *ACTB* was analyzed as a housekeeping transcript. (b) *SNAIL* (29 kDa) was immunoprecipitated and analyzed by Western blot in cells stimulated with 100 μ M UTP; EGF (100 nM) was used as a positive control. (c) *SNAIL* protein was labeled by immunofluorescence in control SKOV-3 cells or stimulated with 100 μ M UTP. DAPI was used to label the nucleus (blue), and rhodamine phalloidin was used to label the actin cytoskeleton (red). The secondary antibody was anti-rabbit IgG coupled to Alexa fluor 488 (green); arrowheads indicate nuclei with *SNAIL* immunoreactivity.

present at concentrations in the hundreds of μ M in the interstitium of tumors induced by the injection of the ovarian carcinoma-derived cells OVCAR-3 [Pellegatti et al., 2008]; this level of nucleotide is sufficient to activate purinergic receptors [Burnstock, 2006], mediating the function and activities of different cells in the tumor [Fitz, 2007].

In this work, we used the carcinoma-derived cell line SKOV-3 as a model to study the possible participation of purinergic signaling in the induction of the migratory phenotype, which is an important process for the induction of metastasis.

First, we tested the effect of different nucleotides on the migratory response of SKOV-3 cells and found a significant increase of migration induced by UTP. This response was detected by two different methods with similar results. Interestingly, we also detected a reduction of basal migration when the cells were incubated with

apyrase, an ectonucleotidase that belongs to the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family. These observations reveal that purinergic receptors and nucleotides released by the SKOV-3 cells themselves are able to modulate their migratory capability.

There are reports that suggest UTP release by different cell types after mechanical stimulation [Harden and Lazarowski, 1999; Lazarowski and Harden, 1999; Jin et al., 2014a]; these findings led us to hypothesize that basal migration could be mediated by co-liberation of ATP and UTP.

In order to identify the receptor associated with the UTP-dependent response, we looked for expression of P2RY receptors in this cell line and found P2RY2 and P2RY4. This result correlates well with the UTP-induced migration, because P2RY2 and P2RY4 are the main UTP-sensitive receptors. Both proteins were also detected by immunofluorescence. To analyze the contribution of

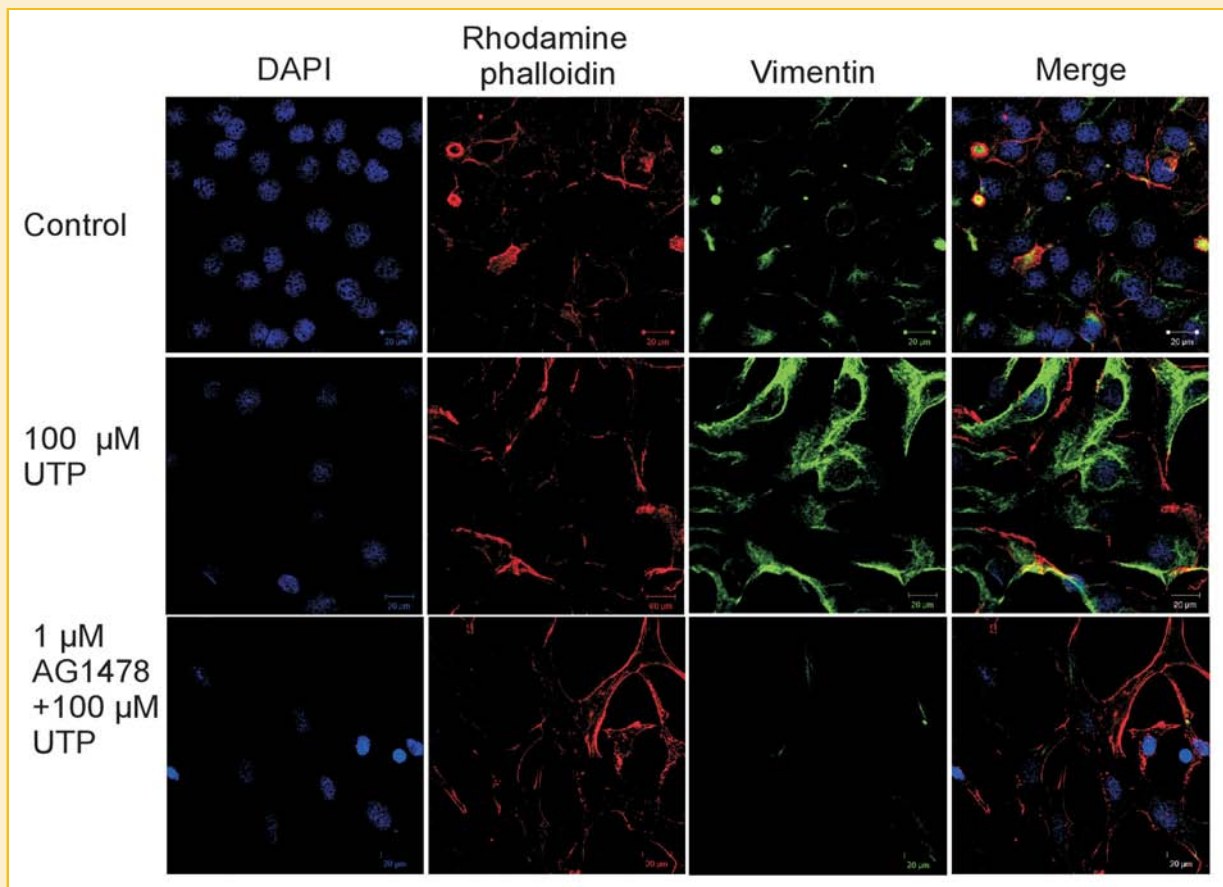


Fig. 7. UTP induced the expression of the EMT marker vimentin in SKOV-3 cells, and this response was dependent on EGFR kinase activity. Immunofluorescence against the mesenchymal marker vimentin in SKOV-3 cells preincubated or not with AG1478 before the stimulation with 100 μ M UTP for 12 h; immunoreactivity was detected with a secondary antibody coupled to Alexa fluor 488 (green signal), the nucleus was labeled with DAPI (blue signal), and the actin cytoskeleton was tagged with rhodamine phalloidin (red signal).

P2RY2 receptor in the cell migration induction, we knocked down expression of the P2RY2 receptor in SKOV-3 cells. In the P2RY2-KD cells UTP was unable to induce cell migration, highlighting the contribution of the receptor in this process. The P2RY2 receptor has been shown to induce migration in various physiological models, for example in microglial cells [Ferreira et al., 2014], skin wound healing [Jin et al., 2014b], smooth muscle [Wiedon et al., 2012], epithelial cells [Boucher et al., 2010], neutrophils [Kukulski et al., 2010], and recently, in different cancer models [Li et al., 2013; Chadet et al., 2014; Jin et al., 2014a; Lamarca et al., 2014; Xie et al., 2014].

It is well known that there are reciprocal protein interactions between GPCR and other receptors, such as tyrosine kinase receptors for growth factors (TKRs) [Chambard et al., 2007]. This crosstalk has been explained by two pathways; one of them depends on the activation of metalloproteinases and the processing of the ligands [Ratchford et al., 2010], and the other requires docking of Src homology 3 binding domains [Liu et al., 2004]. To start delineating the P2RY2-dependent signaling pathway implied by the migratory response of SKOV-3 cells, we looked for possible transactivation of the EGFR receptor.

The evidence generated in this work supporting the idea that the UTP-dependent increase in SKOV-3 cell migration involves EGFR transactivation includes: (1) Preincubation with AG1478, the inhibitor of the kinase activity of the EGFR, inhibits the UTP-induced migration; (2) Wortmannin, an inhibitor of PI3K, a kinase acting downstream from the EGFR, also inhibits the migration induced by UTP; (3) Stimulation with UTP promotes an increased phosphorylation level of EGFR at Tyr1068, a feature of its activation; and (4) the UTP-induced pattern of ERK phosphorylation, a common effector for the canonical P2RY2 pathway and for the EGFR, shows a biphasic response with a peak at 5 min and a second one at 60 min; the presence of AG1478 prevents the UTP-dependent phosphorylation of ERK at 60 min, but not at 5 min, suggesting that ERK is activated by two different mechanisms, and that the mechanism related to the second peak of ERK phosphorylation involves the EGFR kinase activity.

Taken together, this evidence suggests that the migration induced by UTP is mediated through a pathway involving the P2RY2 receptors transactivating the EGFR. It has been shown that different signals should regulate the EGFR, for example lysophosphatidic acid (LPA) and endothelin-1 [Daub et al., 1996], chemokines such as

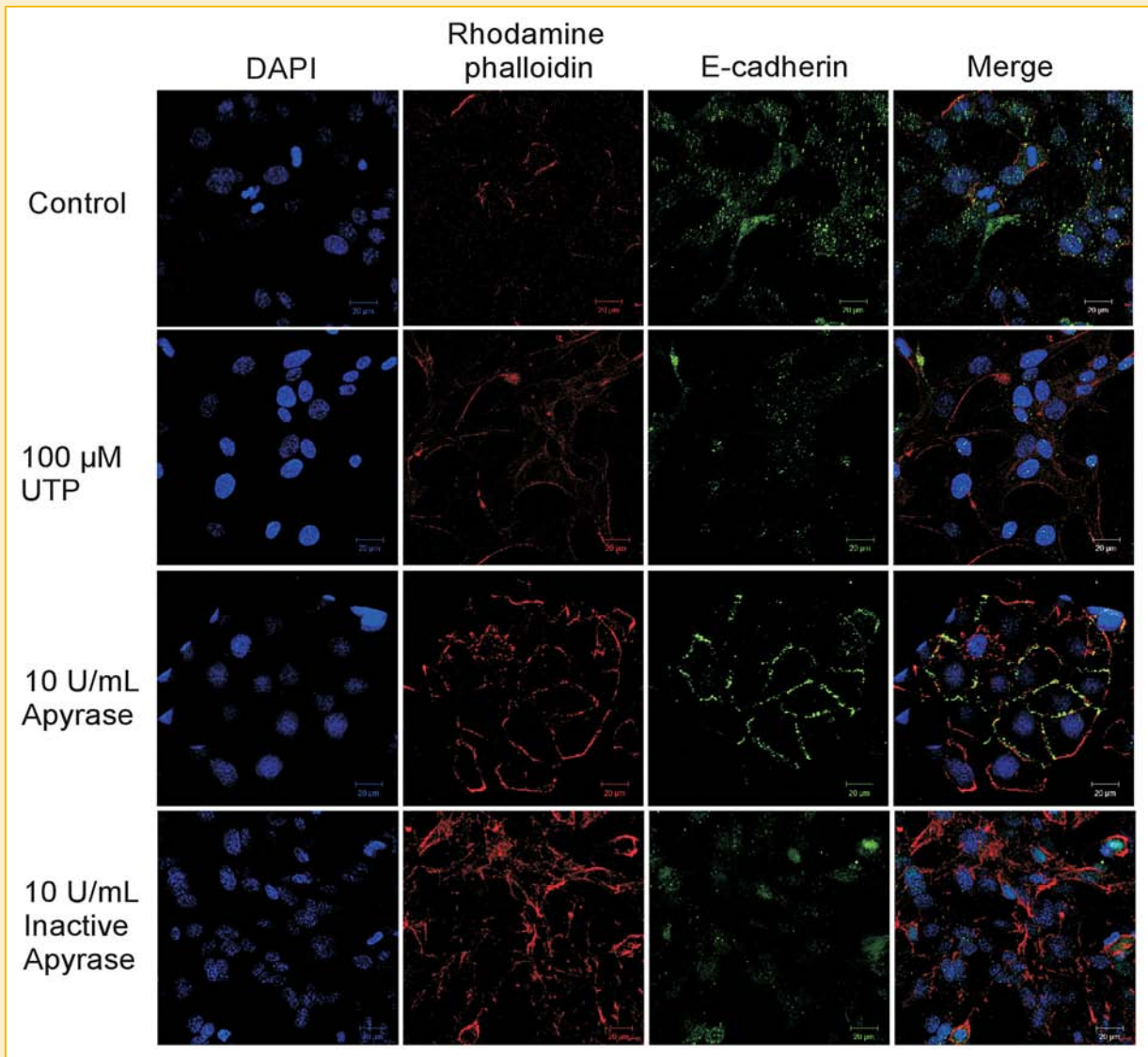


Fig. 8. The expression of E-cadherin is modified by stimulation with exogenous nucleotides or by the addition of the ectonucleotidase apyrase. Immunofluorescence against the epithelial marker E-cadherin in SKOV-3 cells, either control or incubated for 12 h with 100 μ M UTP, 10 U/mL of apyrase, or 10 U/mL of boiled apyrase; immunoreactivity was detected with a secondary antibody coupled to Alexa fluor 488 (green signal). Nuclei were labeled with DAPI (blue signal), and the actin cytoskeleton was tagged with rhodamine phalloidin (red signal).

CXLC1 [Bolitho et al., 2010], cytokines like IL-6 and IL-8 [Itoh et al., 2005; Colomiere et al., 2009], prostaglandin E (PGE2) and bradykinin (BK) [Thomas et al., 2005], and other GPCR ligands in different cancer models, suggesting that EGFR integrates these informational inputs to return a common biological response. This interpretation helps to understand why the overexpression of EGFR correlates with a poor prognosis in patients with advanced stage ovarian cancer [Bull Phelps et al., 2008].

Some evidence has highlighted the importance of the EMT process for the acquisition of a migratory and metastatic phenotype, and of the reverse mechanism MET for the development of a secondary tumor in various cancer models [Grant and Kyprianou, 2013; Kotiyal and Bhattacharya, 2014] and also in ovarian cancer [Zhu et al., 2010]. EMT is activated by different extracellular signals, including

EGF [Acloque et al., 2009]. After activation of the receptors for these ligands, the downstream cascade leads to the expression of SNAIL and other transcription factors that regulate the expression of different proteins involved with the induction of epithelial or mesenchymal phenotypes [Lamouille et al., 2014]. Several pieces of evidence obtained here suggested that the increase of SKOV-3 cell migration by UTP is mediated by EMT: (1) we found an elevation of SNAIL and TWIST transcripts after 16 h of stimulation with UTP; (2) this nucleotide also induced an increase in the expression of SNAIL protein, and in its nuclear translocation; (3) these changes were accompanied by higher expression of vimentin, a classical marker of EMT induction, that was prevented by the presence of AG1878, suggesting that EMT induction by UTP depends on EGFR activity; and (4) E-cadherin expression was down regulated by UTP.

Using immunofluorescence, we noted that E-cadherin was not localized exclusively at the cell junctions, suggesting that control cells have a tonic induction of mesenchymal phenotype. Interestingly, the treatment with apyrase strongly induced an epithelial phenotype, since it resulted in E-cadherin localizing completely in cell-cell junctions, highlighting the importance of nucleotides released from SKOV-3 cells in the development of the cancer characteristics. This result strongly correlates with the diminished migratory capability shown in our initial experiments; also pertinent to mention is that nucleotide release by SKOV-3 is evoked by a mechanical stimulus, as described previously [Vázquez-Cuevas et al., 2014].

Our observations suggest a role for released nucleotides acting through P2RY2 receptors in the acquisition of the mesenchymal phenotype and possible in the metastatic process. Based on these findings, we propose that paracrine interactions in the tumor interstitium environment are determinant for the progression of cancer.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by grants of Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México (number 166725 to FG V-C), and PAPIIT-DGAPA-UNAM, México (number IN205114 to FG V-C). Angélica Sofía Martínez Ramírez is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and received fellowship number 369701 from CONACyT. We are grateful to Dr. Dorothy Pless for editing the manuscript, and to Ing. Alberto Lara Ruvalcaba, ISC Omar Gonzalez Hernández, Ing. Elsa Nydia Hernández Rios, M en C Adriana González Gallardo and M en C Leonor Casanova Rico for their technical assistance. We are also grateful to Dr. Mauricio Díaz by the critical discussion of the study.

REFERENCES

Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions: The importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest* 119:1438–1449.

Anderson NG, Ahmad T, Chan K, Dobson R, Bundred NJ. 2001. ZD1839 (Iressa), a novel epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor, potently inhibits the growth of EGFR-positive cancer cell lines with or without erbB2 overexpression. *Int J Cancer J IntCancer* 94: 774–782.

Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. 2005. The snail genes as inducers of cell movement and survival: Implications in development and cancer. *Dev Camb Engl* 132:3151–3161.

Bhola NE, Grandis JR. 2008. Crosstalk between G-protein-coupled receptors and epidermal growth factor receptor in cancer. *Front Biosci J Virtual Libr* 13:1857–1865.

Bolitho C, Hahn MA, Baxter RC, Marsh DJ. 2010. The chemokine CXCL1 induces proliferation in epithelial ovarian cancer cells by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Endocr Relat Cancer* 17:929–940.

Boucher I, Rich C, Lee A, Marcincin M, Trinkaus-Randall V. 2010. The P2Y2 receptor mediates the epithelial injury response and cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 299:C411–C421.

Bull Phelps SL, Schorge JO, Peyton MJ, Shigematsu H, Xiang LL, Miller DS, Lea JS. 2008. Implications of EGFR inhibition in ovarian cancer cell proliferation. *Gynecol Oncol* 109:411–417.

Burnstock G. 2006. Purinergic signalling—An overview. *Novartis Found Symp* 276:275–281.

Burnstock G. 2007. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci CMLS* 64:1471–1483.

Chadet S, Jelassi B, Wannous R, Angoulvant D, Chevalier S, Besson P, Roger S. 2014. The activation of P2Y2 receptors increases MCF-7 breast cancer cells migration through the MEK-ERK1/2 signalling pathway. *Carcinogenesis* 35:1238–1247.

Chambard JC, Lefloch R, Pouysségur J, Lenormand P. 2007. ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta* 1773:1299–1310.

Colomiere M, Ward AC, Riley C, Trenerry MK, Cameron-Smith D, Findlay J, Ackland L, Ahmed N. 2009. Cross talk of signals between EGFR and IL-6R through JAK2/STAT3 mediate epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinomas. *Br J Cancer* 100:134–144.

Corriden R, Insel PA. 2010. Basal release of ATP: An autocrine-paracrine mechanism for cell regulation. *Sci Signal* 3:re1.

Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A. 1996. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 379:557–560.

Ferreira R, Lively S, Schlichter LC. 2014. IL-4 type 1 receptor signaling up-regulates KCNN4 expression, and increases the KCa3.1 current and its contribution to migration of alternative-activated microglia. *Front Cell Neurosci* 8:183.

Fichter CD, Gudernatsch V, Przepadlo CM, Follo M, Schmidt G, Werner M, Lassmann S. 2014. ErbB targeting inhibitors repress cell migration of esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma cells by distinct signaling pathways. *J Mol Med (Berl)* 92:1209–1223.

Fitz JG. 2007. Regulation of cellular ATP release. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 118:199–208.

Fujiwara S, Terai Y, Kawaguchi H, Takai M, Yoo S, Tanaka Y, Tanaka T, Tsunetoh S, Sasaki H, Kanemura M. et al. 2012. GPR30 regulates the EGFR-Akt cascade and predicts lower survival in patients with ovarian cancer. *J Ovarian Res* 5:35.

Grant CM, Kyprianou N. 2013. Epithelial mesenchymal transition (EMT) in prostate growth and tumor progression. *Transl Androl Urol* 2:202–211.

Harden TK, Lazarowski ER. 1999. Release of ATP and UTP from astrocytoma cells. *Prog Brain Res* 120:135–143.

Itoh Y, Joh T, Tanida S, Sasaki M, Kataoka H, Itoh K, Oshima T, Ogasawara N, Togawa S, Wada T. et al. 2005. IL-8 promotes cell proliferation and migration through metalloproteinase-cleavage proHB-EGF in human colon carcinoma cells. *Cytokine* 29:275–282.

Jin H, Eun SY, Lee JS, Park SW, Lee JH, Chang KC, Kim HJ. 2014a. P2Y2 receptor activation by nucleotides released from highly metastatic breast cancer cells increases tumor growth and invasion via crosstalk with endothelial cells. *Breast Cancer Res BCR* 16:R77.

Jin H, Seo J, Eun SY, Joo YN, Park SW, Lee JH, Chang KC, Kim HJ. 2014b. P2Y2 R activation by nucleotides promotes skin wound-healing process. *Exp Dermatol* 23:480–485.

Kehasse A, Rich CB, Lee A, McComb ME, Costello CE, Trinkaus-Randall V. 2013. Epithelial wounds induce differential phosphorylation changes in response to purinergic and EGF receptor activation. *Am J Pathol* 183:1841–1852.

Kong D, Li Y, Wang Z, Sarkar FH. 2011. Cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition (emt)-phenotypic cells: Are they cousins or twins? *Cancers* 3:716–729.

Kotiyal S, Bhattacharya S. 2014. Breast cancer stem cells, EMT and therapeutic targets. *Biochem Biophys Res Commun* 453:112–116.

Kukulski F, Ben Yebdri F, Bahrami F, Fausther M, Tremblay A, Sévigny J. 2010. Endothelial P2Y2 receptor regulates LPS-induced neutrophil trans-endothelial migration in vitro. *Mol Immunol* 47:991–999.

Lamarca A, Gella A, Martiáñez T, Segura M, Figueiro-Silva J, Grijota-Martínez C, Trullas R, Casals N. 2014. Uridine 5'-triphosphate promotes in

vitro Schwannoma cell migration through matrix metalloproteinase-2 activation. *PloS ONE* 9:e98998.

Lamouille S, Xu J, Derynck R. 2014. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:178–196.

Lazarowski ER, Harden TK. 1999. Quantitation of extracellular UTP using a sensitive enzymatic assay. *Br J Pharmacol* 127:1272–1278.

Liu J, Liao Z, Camden J, Griffin KD, Garrad RC, Santiago-Pérez LI, González FA, Seye CI, Weisman GA, Erb L. 2004. Src homology 3 binding sites in the P2Y2 nucleotide receptor interact with Src and regulate activities of Src, proline-rich tyrosine kinase 2, and growth factor receptors. *J Biol Chem* 279:8212–8218.

Li WH, Qiu Y, Zhang HQ, Liu Y, You JF, Tian XX, Fang WG. 2013. P2Y2 receptor promotes cell invasion and metastasis in prostate cancer cells. *Br J Cancer* 109:1666–1675.

Lowe KA, Chia VM, Taylor A, O'Malley C, Kelsh M, Mohamed M, Mowat FS, Goff B. 2013. An international assessment of ovarian cancer incidence and mortality. *Gynecol Oncol* 130:107–114.

Munkarah AR, Hallum AV, Morris M, Burke TW, Levenback C, Atkinson EN, Wharton JT, Gershenson DM. 1997. Prognostic significance of residual disease in patients with stage IV epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 64:13–17.

Nieto MA. 2009. Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: Old views and new perspectives. *Int J Dev Biol* 53:1541–1547.

Normanno N, De Luca A, Maiello MR, Campiglio M, Napolitano M, Mancino M, Carotenuto A, Viglietto G, Menard S. 2006. The MEK/MAPK pathway is involved in the resistance of breast cancer cells to the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib. *J Cell Physiol* 207:420–427.

Pellegatti P, Raffaghello L, Bianchi G, Piccardi F, Pistoia V, Di Virgilio F. 2008. Increased level of extracellular ATP at tumor sites: In vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PloS ONE* 3:e2599.

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

Teicher BA, Linehan WM, Helman LJ. 2012. Targeting cancer metabolism. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 18:5537–5545.

Thiery JP, Sleeman JP. 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:131–142.

Thomas SM, Grandis JR, Wentzel AL, Gooding WE, Lui VWY, Siegfried JM. 2005. Gastrin-releasing peptide receptor mediates activation of the

epidermal growth factor receptor in lung cancer cells. *Neoplasia N Y N* 7:426–431.

Vázquez-Cuevas FG, Cruz-Rico A, Garay E, García-Carrancá A, Pérez-Montiel D, Juárez B, Arellano RO. 2013. Differential expression of the P2×7 receptor in ovarian surface epithelium during the oestrous cycle in the mouse. *Reprod Fertil Dev* 25:971–984.

Vázquez-Cuevas FG, Martínez-Ramírez AS, Robles-Martínez L, Garay E, García-Carrancá A, Pérez-Montiel D, Castañeda-García C, Arellano RO. 2014. Paracrine stimulation of P2×7 receptor by ATP activates a proliferative pathway in ovarian carcinoma cells. *J Cell Biochem* 115:1955–1966.

Vázquez-Prado J, Casas-González P, García-Sáinz JA. 2003. G protein-coupled receptor cross-talk: Pivotal roles of protein phosphorylation and protein-protein interactions. *Cell Signal* 15:549–557.

Von Kügelgen I. 2006. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther* 110:415–432.

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

Weisman GA, Camden JM, Peterson TS, Ajit D, Woods LT, Erb L. 2012. P2 receptors for extracellular nucleotides in the central nervous system: Role of P2×7 and P2Y2 receptor interactions in neuroinflammation. *Mol Neurobiol* 46:96–113.

Wiedon A, Tölle M, Bastine J, Schuchardt M, Huang T, Jankowski V, Jankowski J, Zidek W, van der Giet M. 2012. Uridine adenosine tetraphosphate (Up4A) is a strong inducer of smooth muscle cell migration via activation of the P2Y2 receptor and cross-communication to the PDGF receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 417:1035–1040.

Xie R, Xu J, Wen G, Jin H, Liu X, Yang Y, Ji B, Jiang Y, Song P, Dong H, et al. 2014. The P2Y2 nucleotide receptor mediates the proliferation and migration of human hepatocellular carcinoma cells induced by ATP. *J Biol Chem* 289:19137–19149.

Zhu Y, Nilsson M, Sundfeldt K. 2010. Phenotypic plasticity of the ovarian surface epithelium: TGF-beta 1 induction of epithelial to mesenchymal transition (EMT) in vitro. *Endocrinology* 151:5497–5505.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

Purinergic Signaling in the Ovary

ANGÉLICA S. MARTÍNEZ-RAMÍREZ AND FRANCISCO G. VÁZQUEZ-CUEVAS*

Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología,
Universidad Nacional Autónoma de México, Juriquilla Querétaro, Querétaro, México



SUMMARY

Adenosine triphosphate (ATP) is released from the cell by multiple mechanisms. The extracellular form of this purine is processed by ectonucleotidases, resulting in a variety of dephosphorylated metabolites that can bind to specific receptors found in the membrane of target cells; such purinergic signaling is important as an autocrine–paracrine intercellular communication system that influences tissue physiology. In this review, we summarize the studies analyzing purinergic activity in the ovary, which can modulate cellular physiology—including sensitivity to gonadotropins—in several ovarian cell types, including the cumulus-cell complex, granulosa cells, theca cells, and the ovarian surface epithelium. These functions, thus, support a role for ATP as an important intra-ovarian messenger, and open new lines of research that can improve our understanding of mechanisms regulating ovarian function and the fine-tuning of folliculogenesis.

[P]urinergic signaling regulates processes including cell proliferation, apoptosis, and steroidogenesis in response to gonadotropic hormones in several ovarian cellular types.

*Corresponding author:
Instituto de Neurobiología
Universidad Nacional Autónoma de México
Boulevard Juriquilla 3001
Juriquilla Querétaro, C.P.
76230, México
E-mail: fvazquezc132005@yahoo.com.mx;
fvazquez@comunidad.unam.mx

Grant sponsor: CONACyT-México;
Grant number: 166725; Grant sponsor:
PAPIIT-UNAM-México; Grant number:
IN205114; Fellowship sponsor:
CONACyT-México; Fellowship
number: 369701

Mol. Reprod. Dev. 82: 839–848, 2015. © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

Published online 20 August 2015 in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com).
DOI 10.1002/mrd.22537

Received 15 May 2015; Accepted 5 August 2015

PURINERGIC SIGNALING

More than 40 years ago, Geoffrey Burnstock put forward the purinergic hypothesis in which he proposed that adenosine triphosphate (ATP) is a neurotransmitter used by specific neurons in the autonomous nervous system (Burnstock, 1972). It is now well known that virtually any cell is able to release ATP in response to various stimuli (Corriden and Insel, 2010), and that ATP can bind to specific receptors in the cellular membrane of target cells and acts as an autocrine–paracrine messenger as well as a neurotransmitter.

The hydrolysis of ATP by specialized extracellular ectonucleotidases, which are essential components of the

Abbreviations: ATP, adenosine triphosphate; BzATP, 2'(3')-O-4-Benzoyl adenosine triphosphate; $[Ca^{2+}]_i$, intracellular concentration of calcium ion; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; CEO, cumulus-enclosed oocyte; ERK1/2, extracellular receptor-activated kinase 1/2; FSH, follicle-stimulating hormone; GPCR, G-protein-coupled receptor; LH, luteinizing hormone; OSE, ovarian surface epithelium; PRKC, protein kinase C; UDP/UTP, uridine di/triphosphate

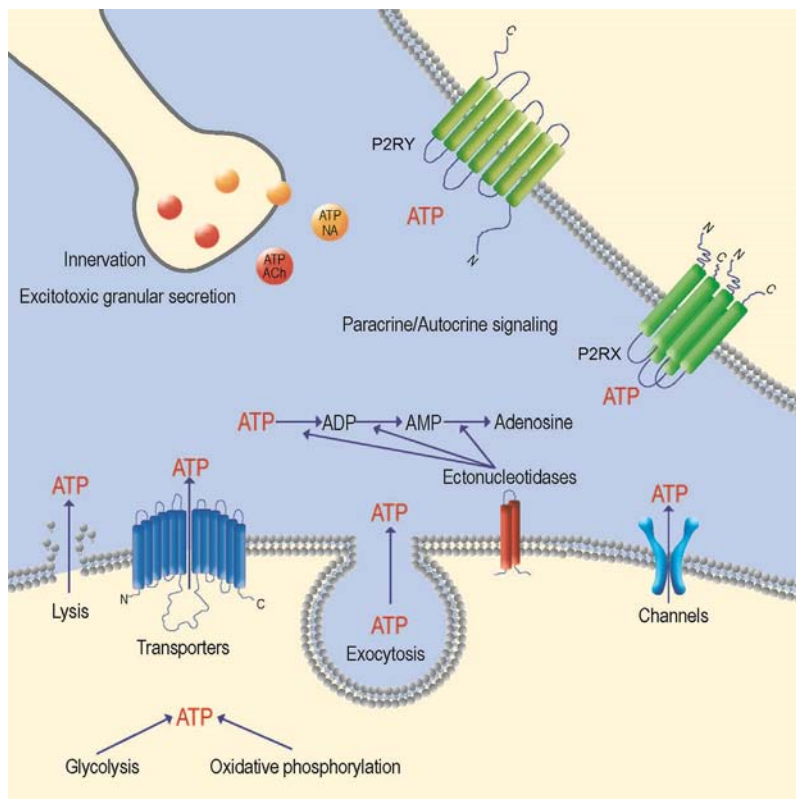


Figure 1. An overview of purinergic signaling. ATP produced inside the cell can be released into the extracellular milieu in different ways: electro-diffusional movement through ion channels such as connexin hemichannels or voltage- and mechanical-activated channels; facilitated diffusion by ATP-binding cassette (ABC) transporters; vesicle trafficking; excitotoxic granular secretion; cell lysis; and co-liberation with neurotransmitters such as acetylcholine and noradrenaline. Once in the extracellular milieu ectonucleotidases on the surface of the membrane degrade ATP and other nucleotides into their various dephosphorylated metabolites. Receptors that are activated specifically by ATP and other nucleotides and nucleosides are present on the surface of the ATP-releasing cell and on its neighboring cells. ATP and its derivatives can, therefore, act as autocrine or paracrine messengers.

purinergic system, occurs in milliseconds, yielding metabolites that play a role in intercellular signaling (Fig. 1). Thus, ectonucleotidases provide a means to attenuate and diversify purinergic signaling (Burnstock, 2006).

ATP and its dephosphorylated metabolites activate specific membrane receptors, thereby mediating particular signal transduction pathways in all cells and tissues; the exact outcome depends on the combination of purinergic receptors exposed on the cell surface as well as how many different response elements are coupled to the active system (Burnstock and Knight, 2004). Identification of which elements are abundant in specific cellular structures of the ovary will, therefore, be essential to understand how purinergic signaling influences their physiology.

Purinergic Receptors

Adenosine, the main agonist for purinergic receptors, is produced rapidly within the extracellular milieu. The main pathways to nucleotide hydrolysis are dephosphorylation of

adenosine monophosphate (AMP) via the enzyme ecto 5'-nucleotidase (NT5E) or by cleavage of S-adenosylhomocysteine by adenosylhomocysteinase (AHCY) (Broch and Ueland, 1980; Zimmermann et al., 1998), although dephosphorylation by enzymes, such as ectonucleotide triphosphate dehydrogenase (ENTPD1-8), ectonucleotide pyrophosphatase/diphosphoesterases (ENPP1-7), and alkaline phosphatases (ALPP, ALPI, or ALPL), also contributes to metabolite hydrolysis. The rate-limiting step of adenosine production by hydrolysis is the dephosphorylation of AMP by NT5E (Yegutkin, 2008). Adenosine can also cross the plasma membrane via transporters that maintain a higher adenosine concentration in the extracellular milieu, including the equilibrating nucleoside transporter members 1 and 2 (SLC29A1 and SLC29A2) and the concentrating-nucleoside transporters (SLC28A1 and SLC28A2) (Fredholm et al., 2001).

Nucleotide-activated receptors are classified into two main families (Table 1): receptors that are activated by adenosine, known as P1, and receptors activated by

TABLE 1. Principal Characteristics of Purinergic Receptors

Receptor	Gene	Receptor type	Main agonist	Main signaling effects	References
ADORA1	ADORA1	GPCR, coupled to G _{αi}	Adenosine	↓cAMP, transactivation of TRKs, PI3K-dependent ERK 1/2 phosphorylation	Schulte and Fredholm [2000]; Dickenson et al. [1998]
ADORA2A	ADORA2A	GPCR, coupled to G _{αs}	Adenosine	↑cAMP, ERK1/2 phosphorylation	Sexl et al. [1997]
ADORA2B	ADORA2B	GPCR, coupled to G _{αs}	Adenosine	↑cAMP; ERK1/2, JNK and p38 phosphorylation	Feoktistov et al. [1999]
ADORA3	ADORA3	GPCR, coupled to G _{αq/11}	Adenosine	Activation of PLC/DAG-IP ₃ /Ca ²⁺ pathway, ERK 1/2 phosphorylation.	Neary et al. [1998]
P2RX1	P2RX1	Ligand-activated ion channel. Forms heterotrimers with P2RX2, P2RX4 or P2RX5	ATP	Influx of Ca ²⁺ and Na ⁺ and efflux of K ⁺ . Ca ²⁺ -dependent ERK 1/2 phosphorylation.	Oury et al. [2002]
P2RX2	P2RX2	Ligand-activated ion channel. Forms heterotrimers with P2RX1, P2RX4, P2RX3, or P2RX6	ATP	Influx of Ca ²⁺ and Na ⁺ and efflux of K ⁺ . Ca ²⁺ -dependent ERK 1/2 phosphorylation.	Swanson et al. [1998]
P2RX3	P2RX3	Ligand-activated ion channel. Forms heterotrimers with P2RX2	ATP	Influx of Ca ²⁺ and Na ⁺ and efflux of K ⁺ . Depolarization, CALM signaling	Lin et al. [1990]
P2RX4	P2RX4	Ligand-activated ion channel. Forms heterotrimers with P2RX1, P2RX2 or P2RX6	ATP	Influx of Ca ²⁺ and Na ⁺ and efflux of K ⁺ . Depolarization, CALM signaling	Lin et al. [1990]
P2RX5	P2RX5	Ligand-activated ion channel. Forms heterotrimers with P2 × 1	ATP	Influx of Ca ²⁺ and Na ⁺ and efflux of K ⁺	Lin et al., 1990
P2RX6	P2RX6	Ligand-activated ion channel. Forms heterotrimers with P2 × 2 or P2RX4	ATP	Influx of Ca ²⁺ and Na ⁺ and efflux of K ⁺ . Depolarization, CALM signaling	Lin et al. [1990]
P2RX7	P2RX7	Ligand-activated ion channel. Only forms homotrimers	ATP	Influx of Ca ²⁺ and Na ⁺ and efflux of K ⁺ . Activation of PI3K, AKT, Src and PRKC; phosphorylation of ERK 1/2 and p38.	Panenka et al. [2001]; Gendron et al. [2003]; Bulanova et al. [2005]
P2RY1	P2RY1	GPCR, coupled to G _{αq/11}	ADP	Release of IL-1β and TNF-α.	Horváth et al. [2014]
P2RY2	P2RY2	GPCR, coupled to G _{αq/11}	UTP=ATP	Activation of PLC/DAG-IP ₃ /Ca ²⁺ pathway. Src-dependent integrin, EGFR and PDGFR activation	Nicholas et al. [1996a]; Soltoff et al. [1998]; Erb et al. [2001]
P2RY4	P2RY4	GPCR, coupled to G _{αq/11}	UTP=ATP	Activation of PLC/DAG-IP ₃ /Ca ²⁺ pathway. inhibition of N-type Ca ²⁺ and M-type K ⁺ channels	Nicholas et al. [1996b]; Filippov et al. [2003]
P2RY6	P2RY6	GPCR, coupled to G _{αq/11}	UDP	Activation of PLC/DAG-IP ₃ /Ca ²⁺ pathway	Nicholas et al. [1996b]
P2RY11	P2RY11	GPCR, coupled to G _{αq/11} and G _{αs}	ATP	Activation of PLC/DAG-IP ₃ /Ca ²⁺ pathway, ↑cAMP	White et al. [2003]
P2RY12	P2RY12	GPCR, coupled to G _{αi}	ADP	↓cAMP	Marteau et al. [2003]
P2RY13	P2RY13	GPCR, coupled to G _{αi}	ADP	↓cAMP	Waldo and Harden [2004]
P2RY14	P2RY14	G _{αi}	UDP-glucose, UDP-galactose	↓cAMP	Harden et al. [2010]

TRK, receptor with intrinsic tyrosine-kinase activity.

adenine and uridine nucleotides, known as P2 (Ralevic and Burnstock, 1998). Four subtypes of P1 receptors have been cloned and characterized: ADORA1, ADORA2A, ADORA2B, and ADORA3; all of them are G-protein coupled receptors (GPCRs) with seven transmembrane domains (Fredholm et al., 2001). P2 receptors, on the other hand, are grouped by their biochemical, pharmacological and molecular characteristics, and are further divided based on their molecular, structural, and functional characteristics. P2RX receptors, for example, form trimeric cationic channels, whereas P2RY receptors are GPCRs (Abbraccio et al., 2006).

P2RX receptors are ligand-activated cation channels activated by adenine nucleotides, but mainly by ATP. Functional receptors are made up of three subunits that form homo- or heterotrimers (Ralevic and Burnstock, 1998; Coddou et al., 2011). Each subunit has two transmembrane domains that flank an extracellular loop containing the ligand-binding site and sites for other modulators; the amino- and carboxy-termini are on the cytoplasmic side (Ralevic and Burnstock, 1998). Seven genes coding for an equal number of P2RX subunits have been cloned (*P2RX1-P2RX7*), although the diversity of this family is further enriched by different splicing variants (Khakh et al., 2001). The main difference among P2RX receptors is their sensitivity to agonists, and, thus, their activation and desensitization rates (Coddou et al., 2011) as well as their pharmacological characteristics.

P2RY receptors, on the other hand, belong to the rhodopsin family of GPCRs. Eight P2RY receptors have been described in mammals, and were named chronologically as they were cloned. The family consists of P2RY1, P2RY2, P2RY4, P2RY6, P2RY11, P2RY12, P2RY13, and P2RY14; the missing numbers correspond to receptor orthologs that have not been found in mammals or share functional and molecular characteristics with P2RY receptors, but have not been shown to be activated by nucleotides (Abbraccio et al., 2006).

PURINERGIC SIGNALING IN THE OVARY

The hypothalamus, pituitary, and ovary constitute the neuroendocrine axis that regulates female reproductive function. The ovary has two fundamental functions: coordinating the development of germ cells and producing steroid hormones. Both processes are controlled by pituitary-derived hormones, whose receptors are found on granulosa and theca cells of the ovarian follicle (Edson et al., 2009).

The ovary has two anatomical zones: the cortex on the outside and the medulla on the inside. The cortex can be further divided into an external and internal layer: the external cortex contains the tunica albuginea, a layer of connective tissue that protects the internal layer, which harbors growing follicles containing the oocyte or oocytes that will be expelled during ovulation (Gougeon, 2003). The ovarian cortex of humans and rodents is encapsulated by a specialized monolayer of mesothelium, the ovarian surface epithelium (OSE) (Auersperg et al., 2001).

Ovarian follicles may be classified by their state of maturity. The most immature version is a primordial follicle, which is characterized by a single layer of squamous epithelial cells surrounding an oocyte. In a primary follicle, this epithelial-cell layer enlarges to form columnar epithelium; the oocyte is arrested in the diplotene stage of meiosis I. When this epithelial-cell layer begins to stratify—first forming a double-thick layer, and later a stratified cuboidal epithelium—the complex is classified as a secondary follicle; in this state, the original epithelial cells are considered proper granulosa cells. The next distinction in follicle maturity is made when fluid-filled spaces appear between the granulosa layers; these spaces later fuse to form one cavity, the antrum, and hence its description as an antral follicle. The granulosa cells subsequently differentiate into mural cells, which remain in contact with the theca layer, and cumulus cells, which remain in contact with the oocyte. These two granulosa cell populations are separated by the antrum, but retain a thin region of contact (Freeman, 1994; Smits and Cortvrint, 2002; Smith et al., 2014).

Several pieces of evidence suggest that an intra-ovarian paracrine/autocrine web of signaling contributes to the tight regulation of ovarian function—including the selection and dominance of the follicles in each ovulatory cycle, determining which of them will degenerate by atresia and which will promote either proliferation or apoptosis of OSE cells during oocyte expulsion (Xu et al., 2013). Purinergic signaling is one of the paracrine regulatory processes used by various cells within the hypothalamic–pituitary–gonadal axis (Corriden and Insel 2010; Burnstock, 2014). The hypothalamus and pituitary gland possess different purinergic receptor profiles (Burnstock, 2014). Furthermore, the anterior pituitary was reported to release ATP, which is rapidly degraded by ectonucleotidases (He et al., 2005). Indeed, adenosine, acting through the ADORA1 receptor, was shown to inhibit the secretion of the gonadotropins follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) by cells of the anterior pituitary (Picanço-Diniz et al., 1999).

A role for extrinsic ovarian innervation has also been explored (Aguado and Ojeda, 1984; Spicer, 1986; Chávez-Genaro et al., 2007). In the cat, for example, the small vesicles within sympathetic nerves innervating the ovary contain norepinephrine and ATP in equimolar concentrations. The abundance of the neurotransmitter in these vesicles correlates with changes in the plasma level of LH observed during the estrous cycle (Lara and Belmar, 1991), suggesting that the direct effects observed within the ovary following stimulation by the nerve are attributable to the adrenergic system. Indeed, a considerable body of evidence indicates that purinergic signaling exerts important intra-ovarian modulation (Table 2 and Fig. 2).

Purinergic Signaling in Theca Cells

The theca is an external cellular layer of the ovarian follicle that receives innervation and contacts the bloodstream. This structure is the direct recipient of hormonal and neural information, and is also responsible for the initial synthesis of steroid hormones. Steroidogenesis begins in

TABLE 2. Purinergic Receptors Described in Ovarian Cells

Model or cell type	Receptor	Detection technique	References
Theca, pig and mouse	P2RX7	RT-PCR, WB, IFC, Ca ²⁺ recording	Vázquez-Cuevas et al. [2006]
Theca, mouse	P2RY2 and P2RY6 and no expression of P2RY4	RT-PCR, WB, Ca ²⁺ recording	Vázquez-Cuevas et al. [2010]
GLC, human and rat	ADORAA2	Pharmacology of cAMP production	Polan et al., [1983]; Behrman et al., [1983]
GLC, mouse	ADORAA2	Pharmacology of cAMP production	Billig & Rosberg [1988]; Billig et al. [1989]
GLC, chicken	P2RY2 or P2RY4 (P2U)	Ca ²⁺ recording	Morley et al. [1994]
GLC, pig	P2RY2 or P2RY4 (P2U)	Ca ²⁺ recording	Kamada et al. [1994]
GLC, human	P2RY2	RT-PCR, WB, Ca ²⁺ recording, cAMP production	Lee et al. [1996]; Tai et al. [2000, 2001a, 2001b, 2004, 2005]
GLC, mouse	P2RY2 or P2RY4	Electrophysiology	Binting et al. [2009]
Luteal cells, mouse	P2RX7	PCR, immunofluorescence	Wang et al. [2015]
Cumulus, mouse	P2RY2	Electrophysiology and RT-PCR	Arellano et al. [2002]
	P2RY2	Ca ²⁺ recording	Webb et al. [2002]
OSE, mouse	P2RX7	RT-PCR, IFC, WB	Vázquez-Cuevas et al. [2013]

GLC, granulosa-luteal cells; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; WB, Western blot; IFC, immunofluorescence.

these cells with the conversion of cholesterol to androgens, which are the starting substrates for the synthesis of estrogens in granulosa cells (Young and McNeilly, 2010).

The first purinergic receptor reported in interstitial theca cells from antral follicles of mouse and swine was P2RX7, a cation channel operated by ATP (Vázquez-Cuevas et al., 2006). Its stimulation with 250 μ M 2'(3')-O-4-Benzoyl adenosine triphosphate (BzATP) or millimolar concentrations of ATP induced an influx of Ca²⁺ and apoptotic cell death (Vázquez-Cuevas et al., 2006). Although the physiological role for P2RX7 in theca cells remains elusive, its ability to promote cell death suggests that it may participate in follicular atresia and/or modulation of the proteolytic cascade that forms the oocyte expulsion channel during ovulation.

Mouse theca cells express *P2ry2* and *P2ry6*, but not *P2ry4* (Vázquez-Cuevas et al., 2010). Stimulation of these theca cells with uridine triphosphate (UTP) or uridine diphosphate (UDP) induces a transitory, concentration-dependent increase in intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i). In agreement with the pharmacology of P2RY2, this effect on calcium levels was blocked by suramin, a general antagonist for P2RY receptors, but not by pyridoxal phosphate-6-azophenyl-2'-4'-disulfonic acid (PPADS), an antagonist for P2RX receptors that exhibits a weak effect on P2RY receptors. UTP was also able to stimulate cell proliferation by a pathway that required an increase of [Ca²⁺]_i and protein kinase C (PRKC) activity and the phosphorylation of the mitogen-activated protein kinase extracellular receptor-activated kinases (ERK 1/2) (Vázquez-Cuevas et al., 2010).

Taken together, these data suggest that purinergic signaling acts as an intra-ovarian modulator that regulates the balance between proliferation and death in theca cells. Its activity may ultimately affect the function and fate of the ovarian follicle.

Purinergic Signaling in Granulosa Cells

Early studies on rat and human granulosa and luteal cells showed that adenosine, via a specific receptor, potentiates the accumulation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and the steroidogenic response induced by LH and FSH (Behrman et al., 1983; Polan et al., 1983). In granulosa cells obtained from mouse preovulatory follicles, this potentiating effect on cAMP production in the presence of gonadotropins is mediated by ADORA2, suggesting that signaling through adenosine and gonadotropins are coupled in order to accelerate cAMP production in these cells (Billig and Rosberg, 1988; Billig et al., 1989). Furthermore, adenosine was reported to abolish the anti-gonadotropic effect of prostaglandin F₂ α (Behrman et al., 1983), which corroborates its positive effect on steroidogenesis.

Extracellular ATP, as well as UTP or UDP, induces an increase in [Ca²⁺]_i in a way that is partially dependent on dihydropyridine-insensitive Ca²⁺ channels in chicken granulosa-luteal cells (Morley et al., 1994). The sensitivity to both adenosine and uridine nucleotides suggests a P2RY receptor is involved. An increase in [Ca²⁺]_i has also been reported for porcine granulosa cells; in this species, pharmacological

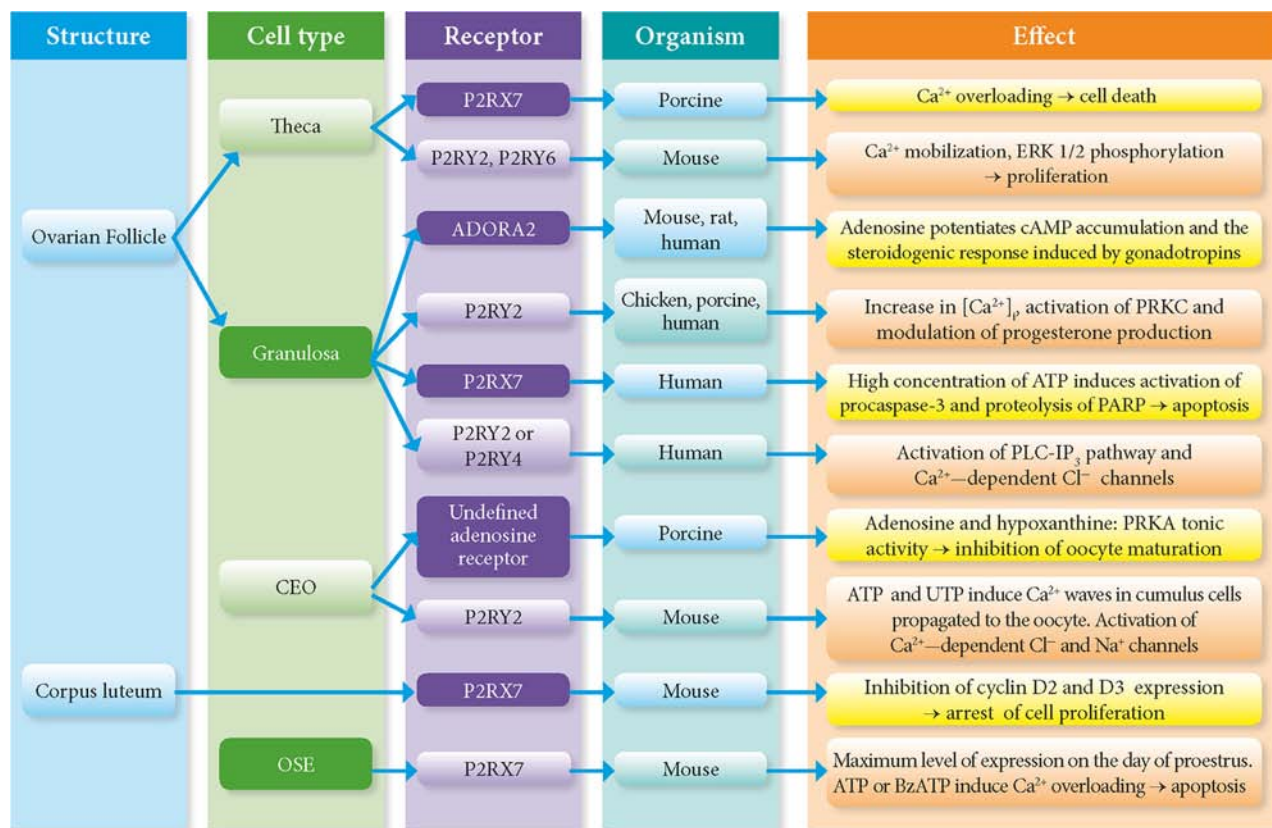


Figure 2. Summary of purinergic receptor activity in the ovarian cells. Details and references are discussed in the text.

characterization implicated the involvement of the UTP-sensitive P2U receptor, now called P2RY2 (Kamada et al., 1994). Human granulosa-luteal cells also express P2RY2 in a manner that is dependent on human chorionic gonadotropin, cAMP, or forskolin (Tai et al., 2000).

ATP also increases progesterone secretion in these cells, indicating a role for P2 receptors in modulating steroidogenesis (Morley et al., 1994). The chorionic-gonadotropin-dependent production of progesterone and cAMP, via the activity of PRKC α , can be antagonized by micromolar concentration of ATP or adenosine in human granulosa-luteal cells (Tai et al., 2001a, Tai et al., 2001b). Therefore, ATP hydrolysis can act as a switch that controls steroidogenesis.

Activation of P2 receptors by ATP also affects the proliferation and cell death of human granulosa-luteal cells. ATP induces the activation and nuclear translocation of ERK 1/2, thereby increasing the expression of genes related to the proliferative response, including early-growth response 1 (*EGR1*) and *RAF1* (Tai et al., 2004). On the other hand, extended exposure (12 hr) to high concentrations of ATP (1–10 mM) can promote the activation of pro-caspase-3 and the proteolysis of poly ADP ribose polymerase (PARP), two markers associated with initial stages of apoptosis (Tai et al., 2005). These antagonistic

responses to ATP are likely mediated by different subtypes of P2 receptors: proliferative responses depend on P2RY receptors whereas apoptotic effects could be mediated by P2RX7. Indeed, activation of P2RX7 in murine small luteal cells inhibited cell proliferation and expression of cyclin D2 (*Ccnd2*) and D3 (*Ccnd3*), suggesting that P2RX7 may be involved in the physiology of the corpus luteum (Wang et al., 2015). Together the plasticity observed in extracellular nucleotide signaling supports a model that purinergic signaling is involved in the dual fates of corpus luteum development versus atresia that occur following ovulation.

An ATP-dependent release of Ca²⁺ from the intracellular stores in mouse granulosa-luteal cells is coordinated by both the inositol triphosphate (IP₃) and ryanodine receptors (ITPR1 and RYR), where phospholipase C (PLC)-dependent IP₃ synthesis initiates signaling by activating its specific receptor to induce Ca²⁺ release. This initial trigger then activates calcium-induced calcium-release from RYR, thereby amplifying the initial calcium response (Morales-Tlalpan et al., 2005). Purinergic-dependent Ca²⁺ signaling was demonstrated in the GFSHR-17 cell line, which was derived from rat granulosa cells. Electrophysiological analysis utilizing perforated patch-clamp indicated that extracellular ATP, via P2RY2 and P2RY4 acting through the PLC-IP₃ pathway, induces a rapid depolarization

followed by a hyperpolarization through activation of Ca^{2+} -dependent Cl^- channels (Bintig et al., 2009).

Experimental evidence from granulosa-luteal cells demonstrates the functional diversity of purinergic receptors as well as the complexity of purinergic regulation. The data further implicate ADORA2A and P2RY2 receptors as modulators of the steroidogenic response to gonadotropins.

Purinergic Signaling in the Ovarian Follicle and Cumulus-Enclosed Oocyte

In the mid-1980's, Eppig et al. showed that the antral fluid of porcine follicles inhibits maturation of murine oocytes in vitro. The main components of the antral fluid that they detected were adenine, uracil, hypoxanthine, and 7-methylinosine. Hypoxanthine and adenosine were mainly responsible for the inhibitory effect on in vitro maturation; moreover, a mix of these two compounds had a synergistic effect (Downs et al., 1985; Eppig et al., 1985; Downs and Eppig, 1986). These authors later hypothesized that both chemical messengers inhibit oocyte maturation via GPCR signaling in order to maintain the tonic activity of cAMP-dependent kinase (PKA) (Downs et al., 1986).

Further investigation into how ATP signaling influences the growth and maturation of the mammalian oocyte has focused on the cumulus-enclosed oocyte (CEO) complex, a preparation that retains the coupling between the isolated oocyte and the granulosa-cumulus cell complex. Live monitoring of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dynamics in the CEO by confocal microscopy demonstrated that activation of P2RY2 with ATP or UTP induced a Ca^{2+} wave beginning in the cumulus cells and propagating to the oocyte through gap junctions (Webb et al., 2002). In contrast, no change to $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the cumulus complex was observed following stimulation by FSH, epidermal growth factor (EGF), angiotensin II, or gonadotropin-releasing hormone (GnRH) (Webb et al., 2002). Electrophysiological studies utilizing the two-electrode voltage-clamp technique on the CEO, with two electrodes inserted in the oocyte, further revealed that application of extracellular ATP or UTP induces membrane depolarization by activating two ionic currents—one corresponding to Ca^{2+} -dependent Cl^- channels and the second to Ca^{2+} -independent Na^+ channels (Arellano et al., 2002). Both currents were blocked by 100 μM suramin, a P2RY-receptor antagonist, as well as octanol, an inhibitor of gap junctions (Arellano et al., 2002). Therefore, purinergic signaling originates at the membrane of cumulus cells as ionic currents, and then passes to the oocyte via gap junctions. Molecular and pharmacological characterization suggested that the currents were elicited through P2RY2, which implies that ATP can function as a highly specific messenger that influences oocyte maturation through the cumulus-cell complex.

Purinergic Signaling in the OSE

The OSE surrounds the ovary, and is composed of a monolayer of cuboidal cells adjacent to the acellular tunica albuginea that covers the ovarian cortical interstitium. Cells

of the OSE are coupled through desmosomes, tight junctions, and gap junctions. The OSE differentiates after the invagination of coelomic mesothelium over the gonadal bridges, and thus has a mesodermal origin, like the epithelia of the urogenital system and adrenal cortex (Murdoch and McDonnell, 2002).

The primary function of the OSE is hypothesized to be mediating the rupture and remodeling of the ovary during ovulation (Li et al., 2007). In the pre-ovulatory stage, for example, the OSE produces proteases, such as a plasminogen activator, that can degrade the regions of the tunica albuginea and the follicular theca-interstitial layer that are in contact with the preovulatory follicle; such proteolysis further induces the expression of metalloproteases by the theca-interstitial cells (Murdoch, 1995). The OSE cells adjacent to the point of rupture undergo apoptosis, forming a channel for expulsion of the CEO (Murdoch, 1994), whereas those cells adjacent to this point undergo an epithelial-to-mesenchymal transition to eventually incorporate into the stroma (Ahmed et al., 2007). During the post-ovulatory stage, surviving OSE cells proliferate to repair the ovarian surface (Murdoch, 1995).

Information about purinergic signaling in the OSE cells is limited. A recent analysis of P2RX7 expression in the mouse ovary revealed that this receptor is present in the OSE cells and co-localizes with keratin 18 (KRT18), an epithelial marker (Vázquez-Cuevas et al., 2013). The abundance of P2RX7 changes during the estrous cycle, peaking on the day of proestrus, when the hormonal changes are focused on ovulation (Vázquez-Cuevas et al., 2013). Such a profile suggests that *P2rx7* expression is hormonally regulated.

The ability of P2RX7 to induce apoptosis was evaluated by intrabursal injection of the selective agonist BzATP in the presence or absence of the antagonist A438079 (Vázquez-Cuevas et al., 2013). Injection of 10 μM BzATP for 24 hr increased the number of apoptotic cells when the mice were in dioestrous or proestrous, which correlates with elevated P2RX7 levels. In vitro experiments with primary cultures of OSE cells further demonstrated that BzATP induces an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ uptake of YO-PRO dye and apoptosis. Thus, functional P2RX7 is expressed in the OSE, in tune with the different phases of the oestral cycle, and may participate in initiation of the ovulatory proteolytic cascade.

PERSPECTIVES

Intercellular messengers involved in the web of paracrine-signaling within the ovary are critical for ovarian physiology. For example, the selection and dominance of follicles during a single oestrous cycle influence by the sensitivity of follicles to gonadotropins, which is regulated by paracrine signaling; exactly which signaling pathways contribute to these events is unclear. Based on the accumulated experimental data reviewed here, the purinergic system emerges as one important intra-ovarian modulator. Indeed, purinergic signaling regulates processes, including cell proliferation, apoptosis, and steroidogenesis, in response to gonadotropic hormones

in several ovarian cellular types. A more detailed description of the elements and mechanisms involved in purinergic signaling in the ovary will, therefore, provide useful insight into the physiology and pathology of this organ.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. Dorothy Pless for editing the manuscript, to graphic designer Edwin Octavio Ramírez Mendieta for editing the images, and to Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera for his critical reading of this review. ASM-R is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas-UNAM. The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems J-M, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA. 2006. International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: From molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 58:281–341.
- Aguado LI, Ojeda SR. 1984. Prepubertal ovarian function is finely regulated by direct adrenergic influences. Role of noradrenergic innervation. *Endocrinology* 114:1845–1853.
- Ahmed N, Thompson EW, Quinn MA. 2007. Epithelial-mesenchymal interconversions in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas: An exception to the norm. *J Cell Physiol* 213:581–588.
- Arellano RO, Martínez-Torres A, Garay E. 2002. Ionic currents activated via purinergic receptors in the cumulus cell-enclosed mouse oocyte. *Biol Reprod* 67:837–846.
- Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC. 2001. Ovarian surface epithelium: Biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev* 22:255–288.
- Behrman HR, Ohkawa R, Preston SL, MacDonald GJ. 1983. Transport and selective utilization of adenosine as a prosubstrate for luteinizing hormone-sensitive adenylate cyclase in the luteal cell. *Endocrinology* 113:1132–1140.
- Billig H, Rosberg S. 1988. Evidence for A2 adenosine receptor-mediated effects on adenylate cyclase activity in rat ovarian membranes. *Mol Cell Endocrinol* 56:205–210.
- Billig H, Rosberg S, Johanson C, Ahrén K. 1989. Adenosine as substrate and receptor agonist in the ovary. *Steroids* 54:523–542.
- Bintig W, Baumgart J, Walter WJ, Heisterkamp A, Lubatschowski H, Ngezahayo A. 2009. Purinergic signalling in rat GFSHR-17 granulosa cells: An in vitro model of granulosa cells in maturing follicles. *J Bioenerg Biomembr* 41:85–94.
- Broch OJ, Ueland PM. 1980. Regional and subcellular distribution of S-adenosylhomocysteine hydrolase in the adult rat brain. *J Neurochem* 35:484–488.
- Bulanova E, Budagian V, Orinska Z, Hein M, Petersen F, Thon L, Adam D, Bulfone-Paus S. 2005. Extracellular ATP induces cytokine expression and apoptosis through P2 \times 7 receptor in murine mast cells. *J Immunol Baltim Md* 174:3880–3890.
- Burnstock G. 1972. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24:509–581.
- Burnstock G. 2006. Purinergic signalling—an overview. *Novartis Found Symp* 276:26–48; discussion 48–57, 275–281.
- Burnstock G. 2014. Purinergic signalling in endocrine organs. *Purinergic Signal* 10:189–231.
- Burnstock G, Knight GE. 2004. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* 240:31–304.
- Chávez-Genaro R, Lombide P, Domínguez R, Rosas P, Vázquez-Cuevas F. 2007. Sympathetic pharmacological denervation in ageing rats: Effects on ovulatory response and follicular population. *Reprod Fertil Dev* 19:954–960.
- Coddou C, Yan Z, Obsil T, Huidobro-Toro JP, Stojilkovic SS. 2011. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol Rev* 63:641–683.
- Corriden R, Insel PA. 2010. Basal release of ATP: An autocrine-paracrine mechanism for cell regulation. *Sci Signal* 3:re1.
- Dickenson JM, Hill SJ. 1998. Potentiation of adenosine A1 receptor-mediated inositol phospholipid hydrolysis by tyrosine kinase inhibitors in CHO cells. *Br J Pharmacol* 125:1049–1057.
- Downs SM, Coleman DL, Eppig JJ. 1986. Maintenance of murine oocyte meiotic arrest: Uptake and metabolism of hypoxanthine and adenosine by cumulus cell-enclosed and denuded oocytes. *Dev Biol* 117:174–183.
- Downs SM, Coleman DL, Ward-Bailey PF, Eppig JJ. 1985. Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation in a low molecular weight fraction of porcine follicular fluid. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:454–458.
- Downs SM, Eppig JJ. 1986. The role of purines in the maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes. *Tokai J Exp Clin Med* 11:463–469.
- Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. 2009. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev* 30:624–712.
- Eppig JJ, Ward-Bailey PF, Coleman DL. 1985. Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: Concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. *Biol Reprod* 33:1041–1049.
- Erb L, Liu J, Ockerhausen J, Kong Q, Garrad RC, Griffin K, Neal C, Krugh B, Santiago-Pérez LI, González FA, Gresham HD, Turner JT, Weisman GA. 2001. An RGD sequence in the P2Y(2) receptor interacts with alpha(V) beta(3) integrins and is required for G(o)-mediated signal transduction. *J Cell Biol* 153:491–501.
- Feoktistov I, Goldstein AE, Biaggioni I. 1999. Role of p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated protein kinase kinase in adenosine A2B receptor-mediated interleukin-8 production in human mast cells. *Mol Pharmacol* 55:726–734.

- Filippov AK, Simon J, Barnard EA, Brown DA. 2003. Coupling of the nucleotide P2Y4 receptor to neuronal ion channels. *Br J Pharmacol* 138:400–406.
- Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. 2001. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53:527–552.
- Freeman ME. 1994. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The physiology of Reproduction*. 2nd ed. New York: Raven Press. p 2327–2388.
- Gendron F-P, Neary JT, Theiss PM, Sun GY, Gonzalez FA, Weisman GA. 2003. Mechanisms of P2 \times 7 receptor-mediated ERK1/2 phosphorylation in human astrocytoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C571–C581.
- Gougeon A. 2003. Dynamics of human follicular growth: Morphologic, dynamic, and functional aspects. In: Adashi PCKLY, editor. *The ovary*. San Diego: Academic Press. pp 25–43.
- Harden TK, Sesma JI, Fricks IP, Lazarowski ER. 2010. Signalling and pharmacological properties of the P2Y receptor. *Acta Physiol Oxf Engl* 199:149–160.
- He M-L, Gonzalez-Iglesias AE, Tomic M, Stojilkovic SS. 2005. Release and extracellular metabolism of ATP by ecto-nucleotidase eNTPDase 1–2 in hypothalamic and pituitary cells. *Purinergic Signal* 1:135–144.
- Horváth G, Göllöncsér F, Csölle C, Király K, Andó RD, Baranyi M, Koványi B, Máté Z, Hoffmann K, Algaier I, Baqi Y, Müller C, Von Kügelgen I, Sperlágh B. 2014. Central P2Y12 receptor blockade alleviates inflammatory and neuropathic pain and cytokine production in rodents. *Neurobiol Dis* 70:162–178.
- Kamada S, Blackmore PF, Oehninger S, Gordon K, Hodgen GD. 1994. Existence of P2-purinoceptors on human and porcine granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 78:650–656.
- Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA, Séguéla P, Voigt M, Humphrey PP. 2001. International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 53:107–118.
- Lara HE, Belmar J. 1991. Release of norepinephrine from the cat ovary: Changes after ovulation. *Biol Reprod* 44:752–759.
- Lee PS, Squires PE, Buchan AM, Yuen BH, Leung PC. 1996. P2-purinoreceptor evoked changes in intracellular calcium oscillations in single isolated human granulosa-lutein cells. *Endocrinology* 137:3756–3761.
- Li M, Zhou T-H, Gao Y, Zhang N, Li J-C. 2007. Ultrastructure and estrogen regulation of the lymphatic stomata of ovarian bursa in mice. *Anat Rec Hoboken* 290:1195–1202.
- Lin JW, Sugimori M, Llinás RR, McGuinness TL, Greengard P. 1990. Effects of synapsin I and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II on spontaneous neurotransmitter release in the squid giant synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8257–8261.
- Marteau F, Le Poul E, Communi D, Communi D, Labouret C, Savi P, Boeynaems J-M, Gonzalez NS. 2003. Pharmacological characterization of the human P2Y13 receptor. *Mol Pharmacol* 64:104–112.
- Morales-Tlalpan V, Arellano RO, Díaz-Muñoz M. 2005. Interplay between ryanodine and IP3 receptors in ATP-stimulated mouse luteinized-granulosa cells. *Cell Calcium* 37:203–213.
- Morley P, Vanderhyden BC, Tremblay R, Mealing GA, Durkin JP, Whitfield JF. 1994. Purinergic receptor-mediated intracellular Ca²⁺ oscillations in chicken granulosa cells. *Endocrinology* 134:1269–1276.
- Murdoch WJ. 1994. Ovarian surface epithelium during ovulatory and anovulatory ovine estrous cycles. *Anat Rec* 240:322–326.
- Murdoch WJ. 1995. Endothelial cell death in preovulatory ovine follicles: Possible implication in the biomechanics of rupture. *J Reprod Fertil* 105:161–164.
- Murdoch WJ, McDonnell AC. 2002. Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis. *Reprod Camb Engl* 123:743–750.
- Neary JT, McCarthy M, Kang Y, Zuniga S. 1998. Mitogenic signaling from P1 and P2 purinergic receptors to mitogen-activated protein kinase in human fetal astrocyte cultures. *Neurosci Lett* 242:159–162.
- Nicholas RA, Lazarowski ER, Watt WC, Li Q, Boyer J, Harden TK. 1996a. Pharmacological and second messenger signalling selectivities of cloned P2Y receptors. *J Auton Pharmacol* 16:319–323.
- Nicholas RA, Watt WC, Lazarowski ER, Li Q, Harden K. 1996b. Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: Identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor. *Mol Pharmacol* 50:224–229.
- Oury C, Toth-Zsomboki E, Vermeylen J, Hoylaerts MF. 2002. P2X(1)-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 2 contributes to platelet secretion and aggregation induced by collagen. *Blood* 100:2499–2505.
- Panenka W, Jijon H, Herx LM, Armstrong JN, Feighan D, Wei T, Yong VW, Ransohoff RM, MacVicar BA. 2001. P2 \times 7-like receptor activation in astrocytes increases chemokine monocyte chemoattractant protein-1 expression via mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 21:7135–7142.
- Picanço-Diniz DL, Valença MM, Favaretto AL, McCann SM, Antunes-Rodrigues J. 1999. Possible involvement of A1 receptors in the inhibition of gonadotropin secretion induced by adenosine in rat hemipituitaries in vitro. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Médicas E Biológicas Soc Bras Biofísica AI* 32:1167–1173.
- Polan ML, DeCherney AH, Haseltine FP, Mezer HC, Behrman HR. 1983. Adenosine amplifies follicle-stimulating hormone action in granulosa cells and luteinizing hormone action in luteal cells of rat and human ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 56:288–294.

- Ralevic V, Burnstock G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50:413–492.
- Schulte G, Fredholm BB. 2000. Human adenosine A(1), A(2A), A(2B), and A(3) receptors expressed in Chinese hamster ovary cells all mediate the phosphorylation of extracellular-regulated kinase 1/2. *Mol Pharmacol* 58:477–482.
- Sexl V, Mancusi G, Höller C, Gloria-Maercker E, Schütz W, Freissmuth M. 1997. Stimulation of the mitogen-activated protein kinase via the A2A-adenosine receptor in primary human endothelial cells. *J Biol Chem* 272:5792–5799.
- Smith P, Wilhelm D, Rodgers RJ. 2014. Development of mammalian ovary. *J Endocrinol* 221:R145–R161.
- Smitz JEJ, Cortvrintd RG. 2002. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reprod Camb Engl* 123:185–202.
- Soltoff SP, Avraham H, Avraham S, Cantley LC. 1998. Activation of P2Y2 receptors by UTP and ATP stimulates mitogen-activated kinase activity through a pathway that involves related adhesion focal tyrosine kinase and protein kinase C. *J Biol Chem* 273:2653–2660.
- Spicer LJ. 1986. Catecholaminergic regulation of ovarian function in mammals: Current concepts. *Life Sci* 39:1701–1711.
- Swanson KD, Reigh C, Landreth GE. 1998. ATP-stimulated activation of the mitogen-activated protein kinases through ionotropic P2×2 purinoreceptors in PC12 cells. Difference in purinoreceptor sensitivity in two PC12 cell lines. *J Biol Chem* 273:19965–19971.
- Tai C-J, Chang S-J, Chien L-Y, Leung PCK, Tzeng C-R. 2005. Adenosine triphosphate induces activation of caspase-3 in apoptosis of human granulosa-luteal cells. *Endocr J* 52:327–335.
- Tai C-J, Chang S-J, Leung PCK, Tzeng C-R. 2004. Adenosine 5'-triphosphate activates nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases leading to the induction of early growth response 1 and raf expression in human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 89:5189–5195.
- Tai CJ, Kang SK, Cheng KW, Choi KC, Nathwani PS, Leung PC. 2000. Expression and regulation of P2U-purinergic receptor in human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1591–1597.
- Tai CJ, Kang SK, Choi KC, Tzeng CR, Leung PC. 2001a. Antigonadotropic action of adenosine triphosphate in human granulosa-luteal cells: Involvement of protein kinase Calpha. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3237–3242.
- Tai CJ, Kang SK, Leung PC. 2001b. Adenosine triphosphate-evoked cytosolic calcium oscillations in human granulosa-luteal cells: Role of protein kinase C. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 86:773–777.
- Vázquez-Cuevas FG, Cruz-Rico A, Garay E, García-Carrancá A, Pérez-Montiel D, Juárez B, Arellano RO. 2013. Differential expression of the P2×7 receptor in ovarian surface epithelium during the oestrous cycle in the mouse. *Reprod Fertil Dev* 25:971–984.
- Vázquez-Cuevas FG, Juárez B, Garay E, Arellano RO. 2006. ATP-induced apoptotic cell death in porcine ovarian theca cells through P2×7 receptor activation. *Mol Reprod Dev* 73:745–755.
- Vázquez-Cuevas FG, Zárate-Díaz EP, Garay E, Arellano RO. 2010. Functional expression and intracellular signaling of UTP-sensitive P2Y receptors in theca-interstitial cells. *Reprod Biol Endocrinol RBE* 8:88.
- Waldo GL, Harden TK. 2004. Agonist binding and Gq-stimulating activities of the purified human P2Y1 receptor. *Mol Pharmacol* 65:426–436.
- Wang J, Liu S, Nie Y, Wu B, Wu Q, Song M, Tang M, Xiao L, Xu P, Tan X, Zhang L, Li G, Liang S, Zhang C. 2015. Activation of P2×7 receptors decreases the proliferation of murine luteal cells. *Reprod Fertil Dev*. doi 10.1071/RD14381
- Webb RJ, Marshall F, Swann K, Carroll J. 2002. Follicle-stimulating hormone induces a gap junction-dependent dynamic change in [cAMP] and protein kinase a in mammalian oocytes. *Dev Biol* 246:441–454.
- White PJ, Webb TE, Boarder MR. 2003. Characterization of a Ca2+ response to both UTP and ATP at human P2Y11 receptors: Evidence for agonist-specific signaling. *Mol Pharmacol* 63:1356–1363.
- Xu J, Xu M, Bernuci MP, Fisher TE, Shea LD, Woodruff TK, Zelinski MB, Stouffer RL. 2013. Primate follicular development and oocyte maturation in vitro. *Adv Exp Med Biol* 761:43–67.
- Yegutkin GG. 2008. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1783:673–694.
- Young JM, McNeilly AS. 2010. Theca: The forgotten cell of the ovarian follicle. *Reprod Camb Engl* 140:489–504.
- Zimmermann H, Braun N, Kegel B, Heine P. 1998. New insights into molecular structure and function of ectonucleotidases in the nervous system. *Neurochem Int* 32:421–425.