BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO DE FISIOLOGÍA

LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

LABORATORIO DE NEUROENDOCRINOLOGÍA

“EFECTO DEL ATP SOBRE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LA LINEA TUMORAL DE CANCER DE MAMA, MDA-MB-231: PAPEL DEL RECEPTOR P_2X_7”

Tesis profesional para obtener el título de:

LICENCIADO EN BIOMEDICINA

Presenta**:**

MARYCRUZ FLORES FLORES

Director de Tesis:

D. en C. EDUARDO MONJARAZ GUZMÁN

ÍNDICE

ABREVIATURAS **4**

R E S U M E N **5**

INTRODUCCIÓN **6**

ANTECEDENTES **7**

1. Cáncer **8**
1.1. Cáncer de mama 12
1.1.1. Descripción general 14

2. Adenosina 5'- trifosfato (ATP) **20**
2.1. Señalización purinérgica y cáncer 21
2.2. Receptores purinérgicos 22
2.2.1. Receptores Purinérgicos P_1 24
2.2.2. Receptores purinérgicos P_2 25
2.2.2.1. Receptores Purinérgicos P_2Y 26
2.2.2.2. Receptores purinérgicos P_2X 27
2.2.3. Receptores purinérgicos P_2 y cáncer 28
2.2.4. Receptor P_2X_7 31
2.2.4.1. Estructura molecular y tridimensional 32
2.2.4.2. Ensamble trimérico 34

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA **37**

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN **37**

HIPÓTESIS **38**

OBJETIVOS **38**

MATERIAL Y MÉTODOS **39**

1. Cultivo celular 40
1.1. Cultivo de la línea celular tumoral, MDA-MB-231 40

2. Tinción con cristal violeta 40

3. Ensayo de expresión génica 41
3.1. Extracción de ARN 41
3.2. Cuantificación de ARN 41
3.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa con transcripción inversa (por sus siglas en inglés, RT-PCR) 42
3.4. Electroforesis 44

4. Ensayo de proliferación 45
4.1. Determinación de proteínas 45
4.1.1. Extracción de proteínas 45
4.1.2. Cuantificación de proteínas 46
4.2. Conteo celular 48

5. Análisis estadístico 49

RESULTADOS 50

DISCUSIÓN 63

CONCLUSIONES 72

BIBLIOGRAFÍA 73

Abreviaturas

Å	Angstrom
aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	Adenosín difosfato
AMP	Adenosín monofosfato
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina sérica de bovino
Bz-ATP	Benzoil benzoil ATP
CAMKII	Proteín cinasa dependiente de calcio/calmodulina
DCIS	Carcinoma ductal *in situ*
ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares
FLC	Fosfolipasa C
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
IDC	Carcinoma ductal invasivo
IL-1β	Interleucina 1β
IP_3	Inositol trifosfato
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NF-κB	Factor nuclear kappa B
nm	Nanómetros
PBS	Buffer de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con transcripción inversa
V	Volts
°C	Grados centígrados
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
µM	Micromolar

RESUMEN

Múltiples estudios han remarcado la importancia del microambiente tumoral para el desarrollo y progresión del cáncer, la presencia de altas concentraciones de ATP ha despertado el interés de la participación de la señalización purinérgica en la evolución del cáncer; con este enfoque la expresión de diversos receptores purinérgicos (P_2) en distintos tipos de cáncer ha sido confirmada, ATP en altas concentraciones ha mostrado poseer actividad antineoplásica y la activación del receptor P_2X_7 ha sido involucrada con un efecto de inhibición de la proliferación celular.

El presente trabajo evaluó el efecto de ATP sobre la proliferación celular de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 a través de los cambios en conteo celular y cuantificación de proteínas. Adicionalmente, se averiguo la presencia de receptores purinérgicos (P_2X y P_2Y) en la línea celular mediante la técnica RT-PCR. Por último, se utilizó un agonista (Bz-ATP) del receptor P_2X_7 para elucidar sí lo posibles cambios en la proliferación celular de línea MDA-MB-231 eran debidos a la activación de este receptor.

Los resultados confirman la actividad antineoplásica de ATP sobre la línea celular MDA-MB-231, el efecto producido mostró ser dependiente de la concentración de ATP, así como de la duración del tratamiento. Los ensayos de RT-PCR confirmaron la presencia de 7 receptores purinérgicos, entre ellos el receptor P_2X_7, mismo que reduce significativamente la cuenta celular al ser activado por 1 mM de ATP y por un tiempo de tratamiento de 72 horas. El efecto de ATP fue mimetizado por la presencia de 250 μM de Bz-ATP, agonista selectivo del receptor P_2X_7, apoyando así la propuesta de la participación de este receptor en el efecto inhibitorio inducido por ATP sobre la capacidad proliferativa en esa línea celular. La expresión del ARNm que codifica para el receptor P_2X_7 es inversamente proporcional al grado de malignidad de las células provenientes de mama.

INTRODUCCIÓN

El cáncer inicia con alteraciones en una célula, estás alteraciones producen un crecimiento incontrolado de células alteradas hasta la formación de una masa tumoral. En 2012, la OMS reportó 14.1 millones de nuevos casos de cáncer, 8.2 millones de muertes por cáncer y 32. 6 millones de personas lo padecen (con al menos 5 años de diagnóstico (OMS, 2012). El cáncer de mama representa el 16% de todos los cánceres femeninos a nivel mundial y ocupa el tercer lugar de incidencia. En México, este tipo de cáncer presentó una incidencia de 22,444 por cada 100,000 mujeres mayores de 20 años en el 20l2, con una tasa de mortalidad de 14.05 para el año 2011 (OMS, 2012; OMS-3, 2014).

Diversos estudios sugieren que el ATP y sus metabolitos juegan un papel importante en el microambiente tumoral modificando la proliferación sin embargo, se desconoce a detalle que receptores purinérgicos participan en estas respuestas; así como el mecanismo molecular involucrado. El ATP ha mostrado evocar efectos antineoplásicos al ser añadido en altas concentraciones al medio de cultivo de células tumorales (Rapaport, 1989).

El presente trabajo pretende determinar, primero, si la presencia de ATP extracelular modifica la capacidad proliferativa de la línea celular de cáncer de mama triple negativo, MDA-MB-231 y segundo, si las posibles alteraciones a la proliferación celular son debidas a la activación del receptor purinérgico P_2X_7.

Antecedentes

1. Cáncer

La Organización Mundial de la salud (OMS), ha definido al cáncer como un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo, y aunque estas enfermedades neoplásicas sean altamente complejas las células cancerígenas exhiben atributos distintos a través de los tipos de tumores que les permiten crecer y alcanzar otros órganos (OMS-3, 2014).

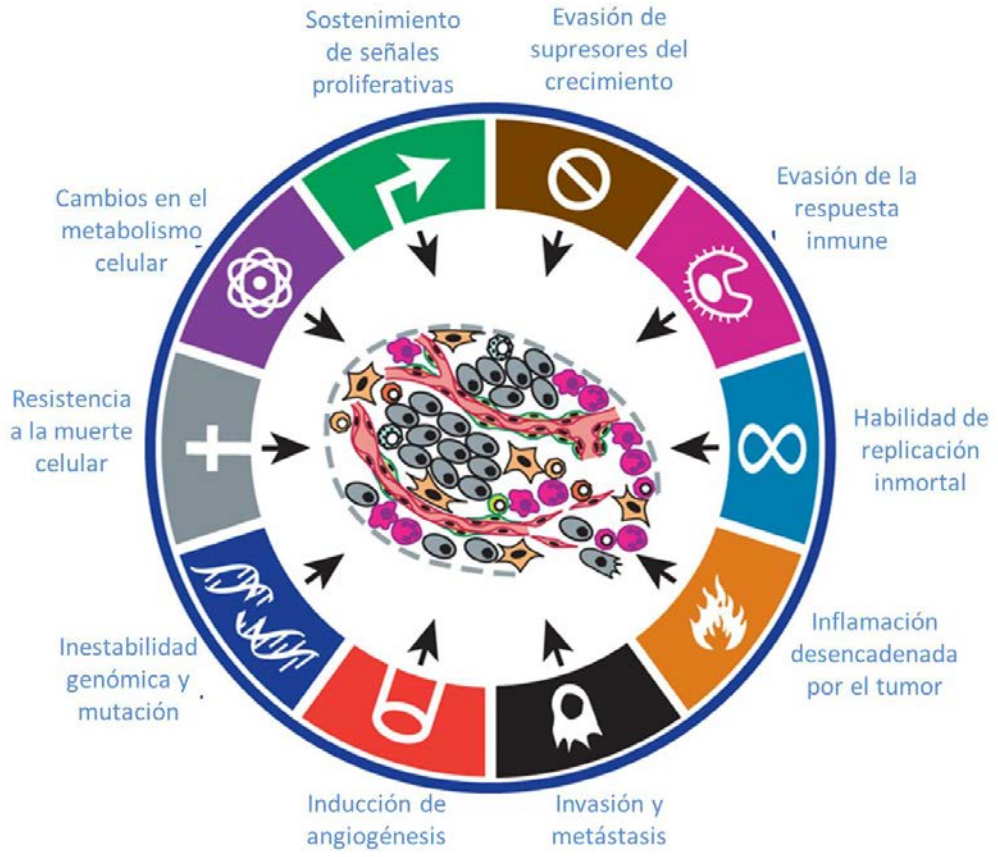


Figura 1. Marcadores y habilidades de las células cancerígenas. El incremento en la investigación sobre el cáncer ha sugerido ocho marcadores particulares de las células cancerígenas: sostenimiento de señales proliferativas, evasión de supresiones del crecimiento, resistencia a la muerte celular, replicación inmortal, activación de la invasión y metástasis, evasión de la destrucción inmune y reprogramación del metabolismo celular; que son adquiridos durante el desarrollo de un tumor, estos constituyen un principio para el entendimiento de las complejas enfermedades neoplásicas. Adicionalmente, dos propiedades son desarrolladas como consecuencia del desarrollo de una neoplasia y permiten la adquisición de los marcadores cancerígenos. La inestabilidad genómica conduce a la progresión del tumor. La inflamación ocasionada por las células inmunes de la respuesta innata puede resultan inadvertidamente en un tipo de soporte de múltiples marcadores, manifestando así las consecuencias de la respuesta inflamatoria como promotora del crecimiento tumoral (Hanahan & Weinberg 2011).

En el curso remarcable del progreso en la investigación del cáncer, nuevas observaciones han servido para crear un marco de trabajo que permita identificar a una célula tumoral de su contraparte no maligna, proporcionando un panorama dentro del cual las múltiples etapas de la transformación hacia una célula letalmente metastásica son comprendidas, estas características son adquiridas en diferentes tipos de tumores vía distintos mecanismos y en tiempo diverso durante el multiproceso de tumorigénesis, les permiten sobrevivir, proliferar y diseminarse. La adquisición de estas características es posible gracias a un par de habilidades que las células cancerígenas desarrollan, la primera y más prominente es el desarrollo de inestabilidad genómica, la segunda involucra el estado inflamatorio presente en las lesiones malignas creado por las células del sistema inmune, algunas de las cuales promueven la progresión de tumor a través de distintos medios. Marcadores y capacidades de una célula cancerígena están representados en la Figura 1 (Hanahan & Weinberg, 2011).

La invasión de tejidos y metástasis son componentes integrales de la estrategia que emplean las células cancerígenas para escapar del sitio primario del tumor y diseminarse dentro de distintos órganos; el proceso de invasión y metástasis no son aún de todo claros, sin embargo, el proceso de metástasis representa la principal causa de muerte por cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011; OMS-3, 2014).

Para el año 2012 la OMS reportó 14.1 millones de nuevos casos de cáncer, 8.2 millones de muertes por cáncer y 32. 6 millones de personas viviendo con cáncer (con al menos 5 años de diagnóstico) en todo el mundo. El 57% (8 millones) de nuevos casos, 65% (5.3 millones) de muertes por cáncer y 48% (15.6 millones) de los casos de prevalencia ocurren en los países menos desarrollados; se prevé que el número de casos detectados aumentará a 22 millones para el año 2030 (OMS, 2012).

La Figura 2, muestra la incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer a nivel mundial, observando que el cáncer pulmonar es el de mayor mortalidad e incidencia con 1.589 millones y 1.824 millones, respectivamente; el cáncer de mama ocupa el segundo lugar de incidencia mundial (1.676 millones) y el cáncer de colon-rectal se ubica en la tercera posición (1.36 millones) le preceden en incidencia; sin embargo, la mortalidad presenta una tendencia diferente, el cáncer de hígado (745 mil muertes) y el de estómago (723 mil muertes) ocupan el segundo y tercer lugar (OMS, 2012).

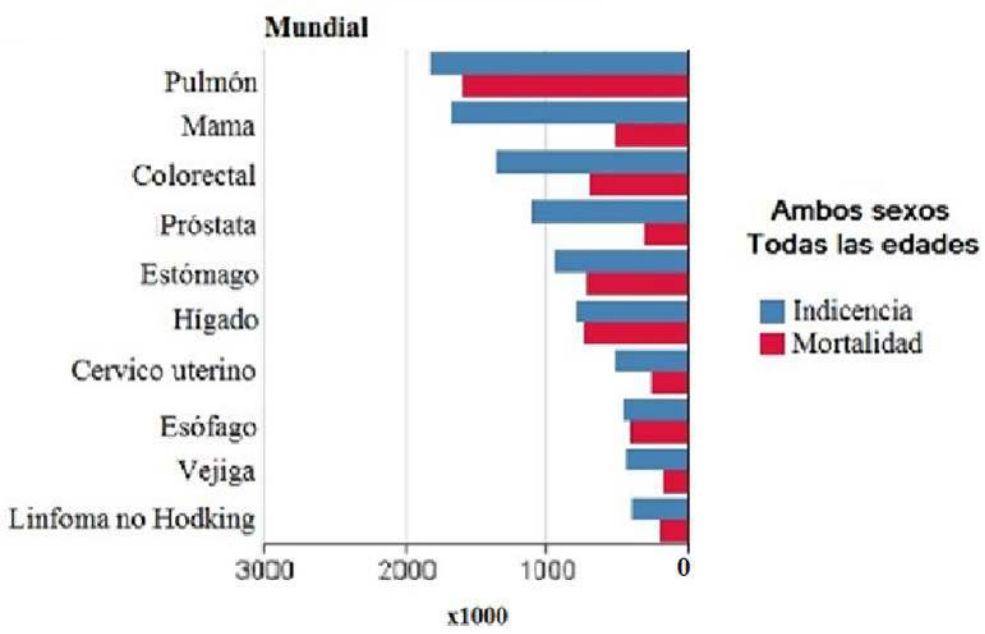


Figura 2. Estimación de la incidencia y mortalidad de los diez principales tipos de cáncer a nivel mundial en ambos sexos. Cáncer de pulmón y mama ocupan primer y segundo lugar en incidencia con 1.824 millones y 1.676 millones, respectivamente; la mortalidad es igualmente encabezada por el cáncer de pulmón, sin embargo es el cáncer de hígado quien ocupa el segundo puesto con 745 mil muertes. Al cáncer de mama se le atribuyeron 521,907 muertes. Modificada de GLOBOCAN 2012 (IARC).

Para el continente americano la OMS reporta la muerte de 1.3 millones de personas por cáncer en el año 2012; las proyecciones epidemiológicas apuntan a que el número de muertes causadas por cáncer en la región de las Américas ascenderá a más de 2.1 millones en el año 2030 (OMS-4, 2011).

En México, según la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) el cáncer presenta una incidencia considerable con 128 mil casos nuevos detectados cada año y es la tercera causa de muerte (UICC, 2014).

Los tumores malignos que más padece la población mexicana adulta son diferentes según el género: en 2011 para los hombres la principal causa de morbilidad hospitalaria por cáncer fue debida a las neoplasias en órganos digestivos (23.9%), le siguieron los tumores en órganos genitales (12.2%), siendo el de próstata el más frecuente; y los de órganos hematopoyéticos (9.8%). En las mujeres la principal causa de ingreso hospitalario se debió

al de cáncer de mama (29.6%); en segundo lugar, las neoplasias en órganos genitales (16.7%), tales como cervico-uterino, del cuello del útero y útero; finalmente, las neoplasias en órganos digestivos (14.3%) (INEGI, 2014).

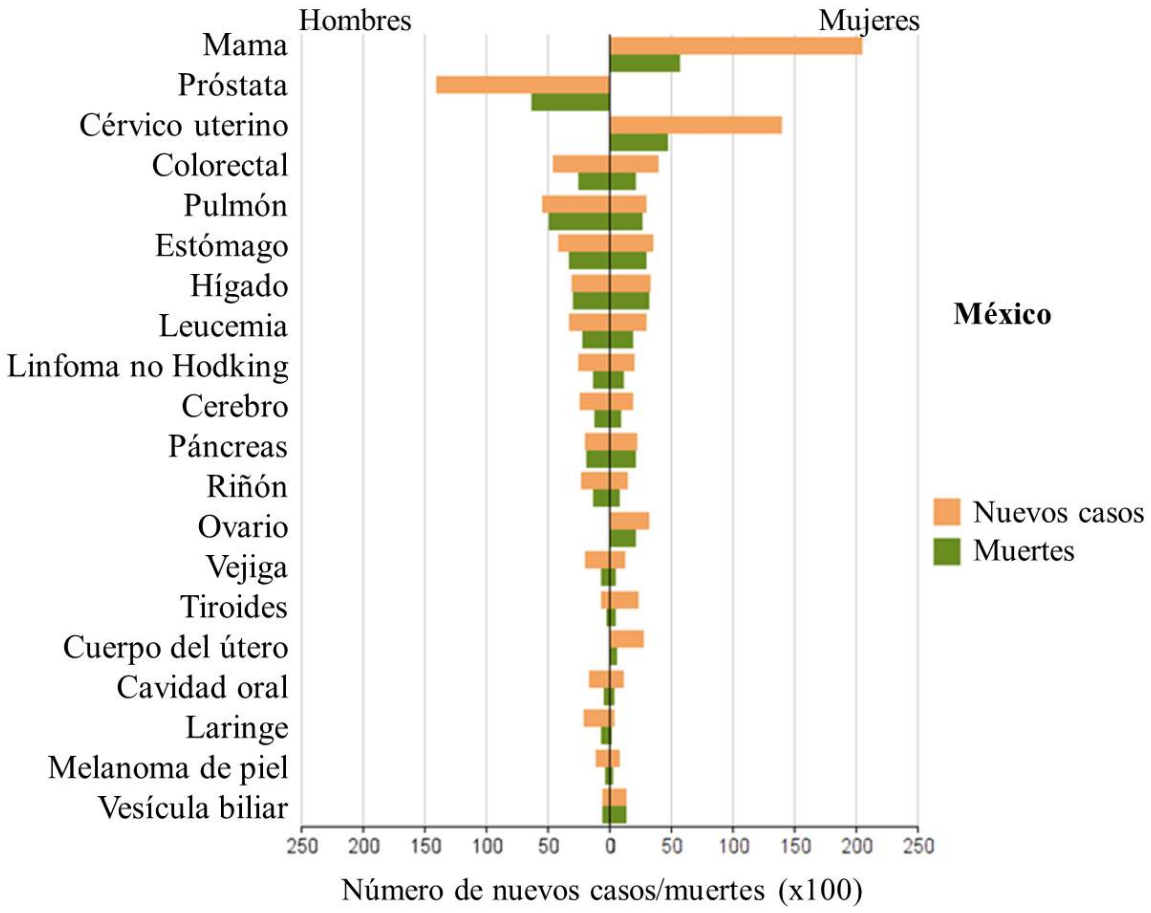


Figura 3. Estimación de la incidencia y mortalidad de los diez principales tipos de cáncer en México por sexos. Los tipos de cáncer que afectan a los mexicanos son diferentes en cada sexo; para los hombres próstata, pulmón, colon y estómago son los órganos más frecuentemente afectados empero, para las mujeres el cáncer tiende a desarrollarse con más frecuencia en la mama y el cuello uterino; la incidencia de cáncer de mama es tan grande que es necesario tomar los datos de incidencia de cáncer próstata y pulmón (en hombres, 14,016 mil y 5,471 mil, respectivamente) juntos para poder igualar la cifra. Modificada de GLOBOCAN 2012 (IARC).

En 2012 la OMS presento datos para México esquematizados en la Figura 3, los cuales muestran que el cáncer de próstata fue el de mayor incidencia y mortalidad (14,016 nuevos

casos y 6,367 muertes) en hombres mientras que para las mujeres el cáncer de mama encabezó la lista de incidencia con una presencia 145% veces mayor (20,444 nuevos casos) con respecto al cáncer de próstata. También podemos observar que a diferencia del gráfico de distribución mundial de la Figura 2, el cáncer de pulmón para los hombres ocupa el segundo lugar de incidencia y mortalidad mientas que para las mujeres se localiza en el quinto lugar de incidencia y mortalidad (OMS, 2012).

1.1. Cáncer de mama

El cáncer de mama es el más común entre las mujeres en todo el mundo pues representa el 16% de todos los cánceres femeninos. Se estima que en 2004 murieron 519 000 mujeres por cáncer de mama y, aunque este cáncer está considerado como una enfermedad del mundo desarrollado, la mayoría (69%) de las defunciones por esa causa se registran en los países de bajos y medios ingresos como México donde su impacto en la población es mayor debido a las deficiencias y carencias que presentan sus sistemas de salud (OMS-2, 2013).

La OMS reportó en 2012 que en el año 2008 fallecieron 458 mil mujeres por cáncer de mama a nivel mundial mostrando una reducción en la mortalidad pero un incremento en la incidencia; la Organización Panaméricana de la Salud (OPS), por su parte, registró la muerte de 82 mil mujeres en América a consecuencia de esta enfermedad. (OMS-5, 2013) En México, la tasa de mortalidad por cáncer de mama en mujeres de 20 años y más fue de 14.05 en el año 2011; la Figura 4 presenta la distribución de las tasa de mortalidad de las 31 entidades federativas y el Distrito Federal de la República Mexicana se muestra la media nacional. Destacando el Distrito Federal (con una tasa de mortalidad de 20.55), Chihuahua (20.71) y Baja California Sur (19.08); mientras que las entidades con menor tasa de mortalidad son Quintana Roo (5.96), Oaxaca (7.18) y Campeche (8.18) (INEGI, 2014; SSP, 2014).

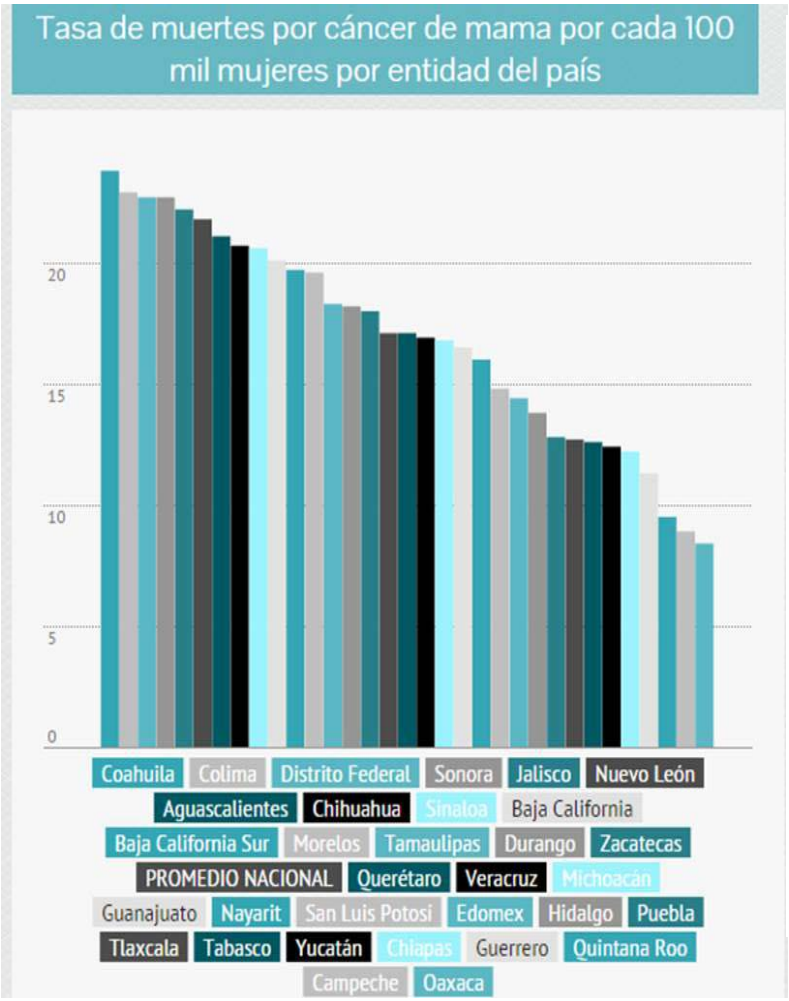


Figura 4. Tasa de mortalidad por cáncer de mama por cada 100 mil mujeres por entidad del país de 20 años y más. El promedio nacional se ubica en 17.1, los estados con los más altos valores son Coahuila (23.9), Colima (22.9) y distrito Federal (22.7); los que poseen los valores más bajos son Quintana Roo (9.5), Campeche (8.9) y Oaxaca (8.4). Los estados que constituyen la región norte del país superan la media nacional, estados que se ubican en el centro del país no superan esta tasa, exceptuando el Distrito Federal. La tasa de mortalidad del estado de Puebla se ubica en 12.8 (SSP, 2014).

Se conocen bien varios factores de riesgo del cáncer de mama. Sin embargo en la mayoría de las mujeres afectadas no es posible identificar factores de riesgo específicos; los principales factores de riesgo de tipo genético son mutaciones en los genes *BRCA1*, *BRCA2* y *p53*, estas mutaciones son menos comunes, presentándose en menos del 5% de los casos detectados de cáncer de mama; mientras que más del 95% de los casos de cáncer de mama se deben a factores ambientales, como por ejemplo: tratamientos prolongados con estrógenos, una menarquia precoz, una menopausia tardía, nuliparidad o embarazo en edad madura, la edad, alimentación, dieta, obesidad, falta de actividad física, consumo excesivo de alcohol, entre otros muchos factores (OMS-2, 2013).

1.1.1. Descripción general

Para entender el origen y desarrollo del cáncer de mama es necesario conocer algunos aspectos básicos de la estructura anatómica de la glándula mamaria. La mama está formada por tejido de sostén (glandular y graso, mayoritariamente), su interior está conformado por 15 a 20 lóbulos (Fig. 5), cada lóbulo a su vez está constituido por lobulillos los cuales contienen grupos de células glandulares responsables de la producción de leche, rodeados de vasos sanguíneos y linfáticos; posterior al alumbramiento, la leche producida por las células glandulares fluye a los lóbulillos, quienes la conducen hacia el pezón a través de delgados tubos conocidos como ductos; el tejido conectivo y graso rodea y llena el espacio entre ductos y lóbulos (NCI, 2014; ACS, 2014).

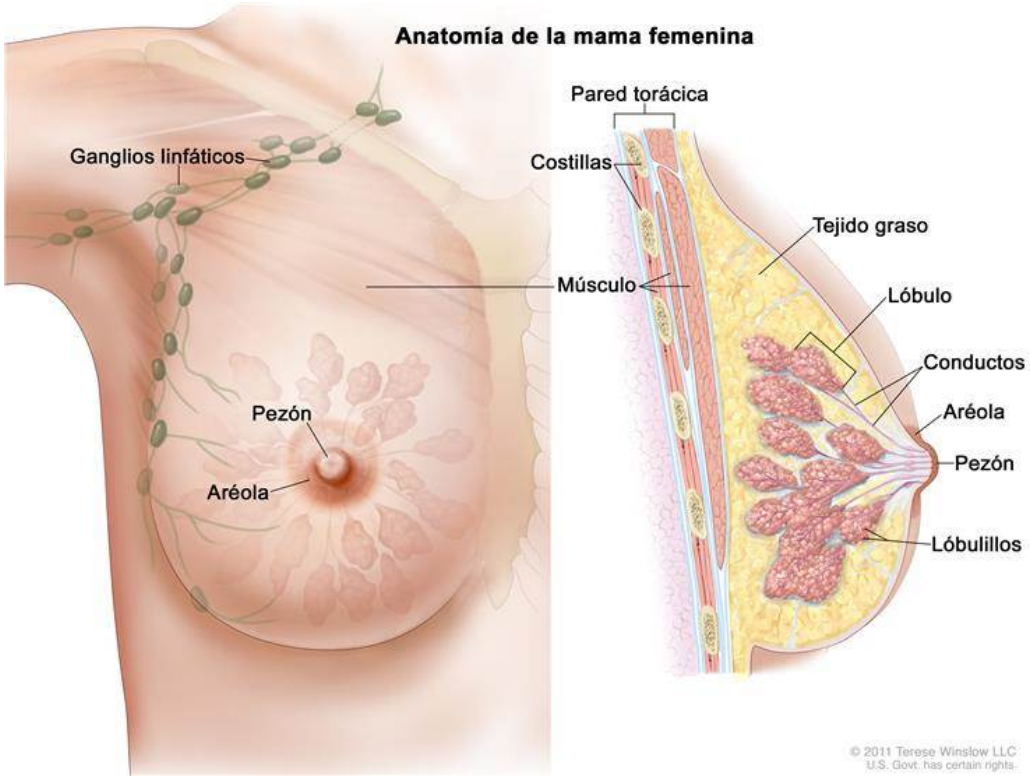


Figura 5. Anatomía de la mama femenina. Se muestran el pezón y la aréola en la parte externa de la mama. Por la parte interna el tejido de sostén (conectivo y graso, representa el 70%), también se muestran los ganglios linfáticos, los lóbulos, los lobulillos y los conductos.

Los vasos linfáticos salen de la mama y transportan un fluido claro, llamado linfa, fuera de la mama. La linfa contiene fluido de los tejidos, productos de desecho y células del sistema inmune hacia los ganglios localizados debajo de la axila justo debajo del brazo (nodos axilares), otros más situados en la cercanía de los huesos que se relacionan con la mama (nodos mamarios internos) y los ubicados encima y debajo de la clavícula (nodos supraclaviculares o infraclaviculares). La importancia del sistema linfático radica en que las células cancerígenas pueden ingresar a los vasos linfáticos, viajar por la linfa y de ahí dirigirse hacia otros órganos para invadirlos (NCI, 2014; ACS, 2014).

Hasta el inicio de la pubertad (alrededor de los 13 años), niños y niñas presentan una cantidad ligera de tejido mamario, consistente en pocos ductos localizados debajo del pezón y la areola. En la pubertad, la actividad endocrina del ovario se incrementa, presentándose un aumento en los niveles de producción de hormonas esteroideas, las cuales estimulan el crecimiento y maduración de la glándula mamaria (ACS, 2014).

La glándula mamaria es un órgano que sufre una extensiva remodelación y diferenciación aún en mujeres adultas. Cambios hormonales en cada ciclo menstrual producen ondas de proliferación en el epitelio de la mama, mientras el embarazo produce una extensa ramificación ductual y alveogénesis. Basado en estas observaciones, la existencia de células madre epiteliales fue propuesto, diferentes estudios han mostrado la existencia de un grupo de células epiteliales de mama que son capaces de formar colonias *in vitro* y dan lugar a células luminales y mioepiteliales; recientemente células madre epiteliales fueron localizadas en los ductos y no al final de los lobulillos. La Figura 6 muestra un modelo hipotético del origen de una de las células que recubren los ductos y los lóbulos mamarios, el desarrollo y la función de la glándula están bajo control hormonal, y un subconjunto de células epiteliales expresen receptor para estrógenos y progesterona; contrariamente a las células de cáncer responsivas a estrógenos, las células epiteliales que poseen este receptor no proliferan en respuesta a estrógenos pero las células que las rodean poseen una alta tasa replicativa, lo que indica que factores paracrinos pueden mediar la actividad mitogénica del epitelio mamario (Polyak, 2007).

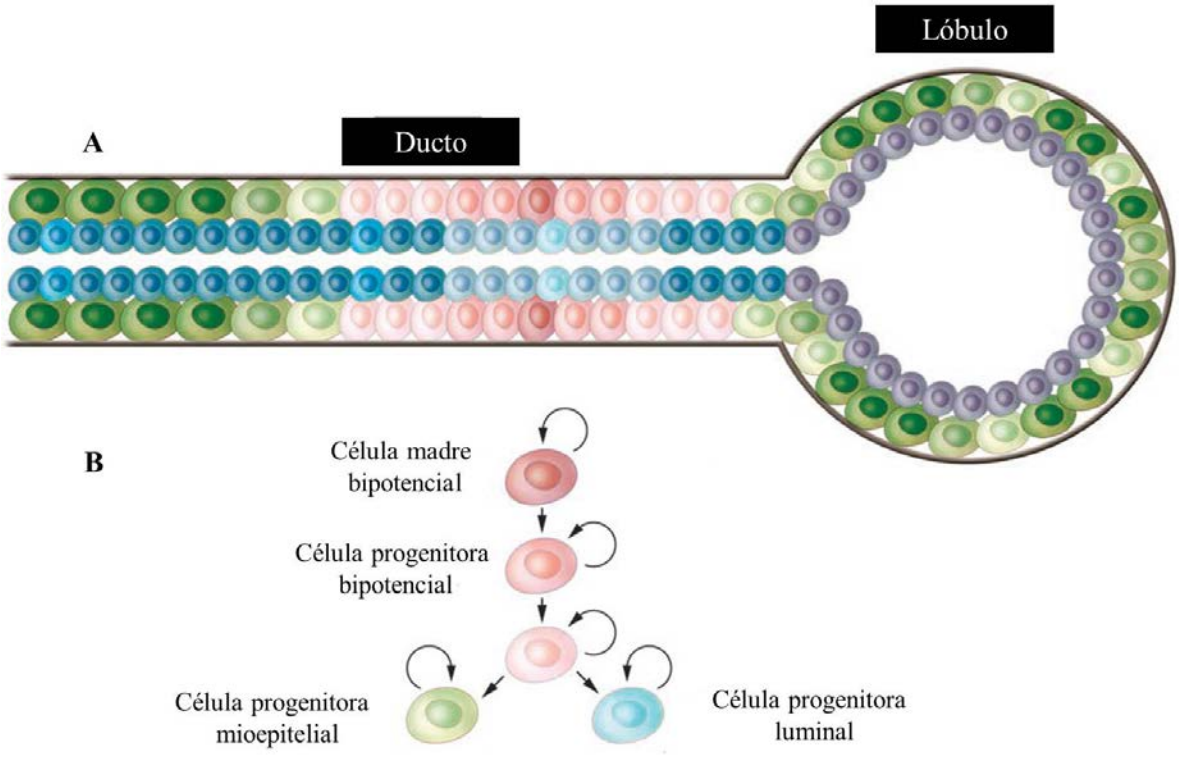


Figura 6. Modelo humano hipotético de las células madre epiteliales de la mama que muestra la jerarquía y diferenciación. A, la imagen muestra la posible estructura de una unidad lobular con un conducto terminal y la posible ubicación de las células madre, la línea gris representa la membrana basal. B, Una célula madre epitelial bipotencial da lugar a células luminales y mioepiteliales pero los pasos intermedios y su regulación son en gran parte desconocidos (Polyak, 2007).

El inicio del cáncer de mama se debe a los eventos de transformación (genética y epigenética) ocurridos en una sola célula, mientras que la progresión subsecuente del tumor es dirigida por la acumulación adicional de cambios genéticos combinados con la expansión clonal y selección. La historia natural del cáncer de mama involucra la progresión a través de estados definidos comenzando con hiperproliferación epitelial, seguida de una evolución atípica y transformación celular, desarrollo del carcinoma *in situ*, y finalmente cáncer invasivo con características metastásicas; la Figura 7 presenta un modelo hipotético de la progresión del cáncer de mama desde su origen hasta la metástasis. Datos clínicos y experimentales sugieren que el carcinoma ductal *in situ* (DCIS) es el precursor del carcinoma ductal invasivo (IDC) (Polyak, 2007).

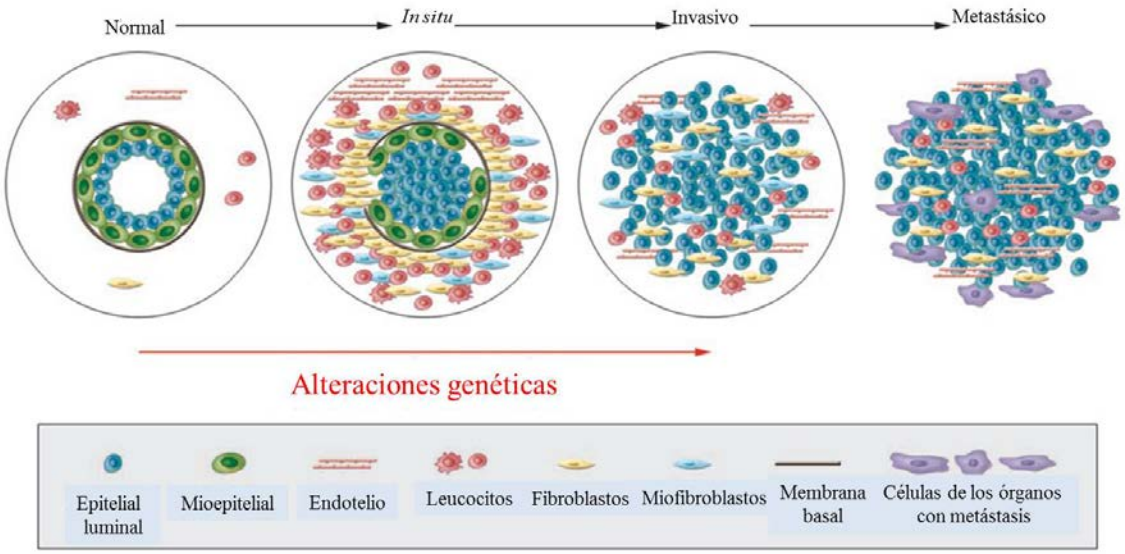


Figura 7. Modelo hipotético de la progresión de un tumor de mama. Vista esquemática normal, *in situ*, invasiva y metástasis de carcinoma. Los ductos normales están rodeados de una membrana basal y una capa luminal de células epiteliales y mioepiteliales. Las células que componen el estroma incluyen leucocitos, fibroblastos, miofibroblastos y células endoteliales. En el carcinoma *in situ* las células están genéticamente y fenotípicamente alteradas y el número decremento potencialmente debido a la degradación de la membrana basal. Al mismo tiempo, el número de fibroblastos estromales, miofibroblastos, linfocitos y células endoteliales aumenta. La pérdida de las células mioepiteliales y de la membrana basal resulta en un carcinoma invasivo, en el cual las células cancerígenas pueden invadir tejidos cercanos y migrar hacia órganos distantes, eventualmente desarrollando metástasis (Polyak, 2007).

La transición de DCIS a carcinoma invasivo y la propagación metastásica a distintos órganos es aún poco entendida, sin embargo el criterio diagnóstico que distingue el cáncer invasivo del carcinoma *in situ* es la pérdida de la capa de células mioepiteliales. Las células de cáncer de mama pueden diseminarse lejos del tumor inicial, viajando a través de los vasos sanguíneos o de los vasos linfáticos para llegar a tejidos y órganos secundarios. Las células tumorales de mama tienen una gran afinidad por invadir hueso, pulmón y cerebro (Polyak, 2007).

Los tumores que pueden desarrollarse en la mama pueden ser benignos o malignos, los primero no son cancerígenos o perjudiciales, rara vez invaden tejidos adyacentes, no se diseminan y una vez extirpados no suelen ser reincidentes; los segundos son cancerígenos, comprometen la vida, son capaces de invadir tejidos cercanos, se propagan a otras partes del cuerpo y tienden a ser reincidentes después de ser extirpados. El tipo más común de

tumor maligno que se presenta en la mama es el carcinoma ductal, siete de cada diez mujeres lo padecen; el segundo tipo más común es el carcinoma lobular, una de cada diez mujeres. Algunas mujeres presentan una mezcla de cáncer ductal o lobular, o tienen un tipo de cáncer de mama menos común (ACS, 2014).

Actualmente, el paciente que padece cáncer de mama tiene diversas opciones de tratamiento, este debe ser personalizado puesto que la prognosis y la efectividad del tratamiento dependen de muchos factores tales como: estadio del cáncer, tipo de cáncer de mama, niveles de expresión de los receptores a estrógeno, progesterona y del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER-2), edad, estado general de salud, estado menopáusico, rapidez de crecimiento del tumor; los diferentes tratamientos incluyen: terapia hormonal, terapia dirigida, quimioterapia, radioterapia y cirugía. La enfermedad en sus etapas iniciales es altamente curable pero si hay evidencia de recurrencia o metástasis, el pronóstico es negativo (ACS, 2014).

Los cánceres de mama triple negativo (carecen de receptores a estrógenos, progesterona y factor de crecimiento epidérmico) se caracterizan por una historia clínica agresiva, tienen una supervivencia menor a cinco años (77% comparados con 93% de otros tipos de cáncer). Tienden a presentarse como tumores poco diferenciados haciendo que aumente hasta 16 veces la posibilidad de desarrollar cáncer de mama triple negativo en estadios tempranos. El cáncer de mama triple negativo se presentó cinco veces más en menores de 40 años comparado con tumores luminales, y 63% de los cánceres de mama triple negativo fueron diagnosticados antes de los 60 años comparados con menos de la mitad entre los otros tipos de tumor (Guzmán, 2005).

Durante el desarrollo de un tumor, las células cancerígenas mantienen una comunicación bidireccional entre las células vecinas y el microambiente que las rodea, en particular con las células estromales con las cuales se establece una poderosa relación directa que influye en el inicio, la progresión y la prognosis del cáncer. Ahora es evidente que los tumores deben parte de su diversidad a la naturaleza de su microambiente y a la fracción de células estromales presentes. En respuesta a las condiciones ambientales y a las señales oncológicas de crecimiento, el desarrollo del cáncer cambia sobre el curso de la progresión

debido a la necesidad de adaptación a diversos de microambientes, tales como el torrente sanguíneo, linfático, ganglios linfáticos y el de los órganos blanco (Quail & Joyce, 2013).

Una característica interesante del microambiente tumoral es la presencia de altos niveles de ATP, el papel del ATP en el microambiente tumoral es controversial pues un efecto dual ha sido descrito: promotor e inhibidor del crecimiento celular. (Pellegatti *et al.*, 2008) Las acciones antineoplásicas son debidas a la inhibición de la proliferación, la inducción de la diferenciación celular, a la muerte celular o a una combinación de estos procesos, las cuales el ATP ha sido capaz de inducir; es importante mencionar que tanto ATP como sus metabolitos ADP, AMP y adenosina, son capaces de desencadenar la señalización purinérgica y que la respuesta emitida depende del subtipo de receptor expresado y activado en el tumor, (Fig. 8) (Burnstock, 2013).

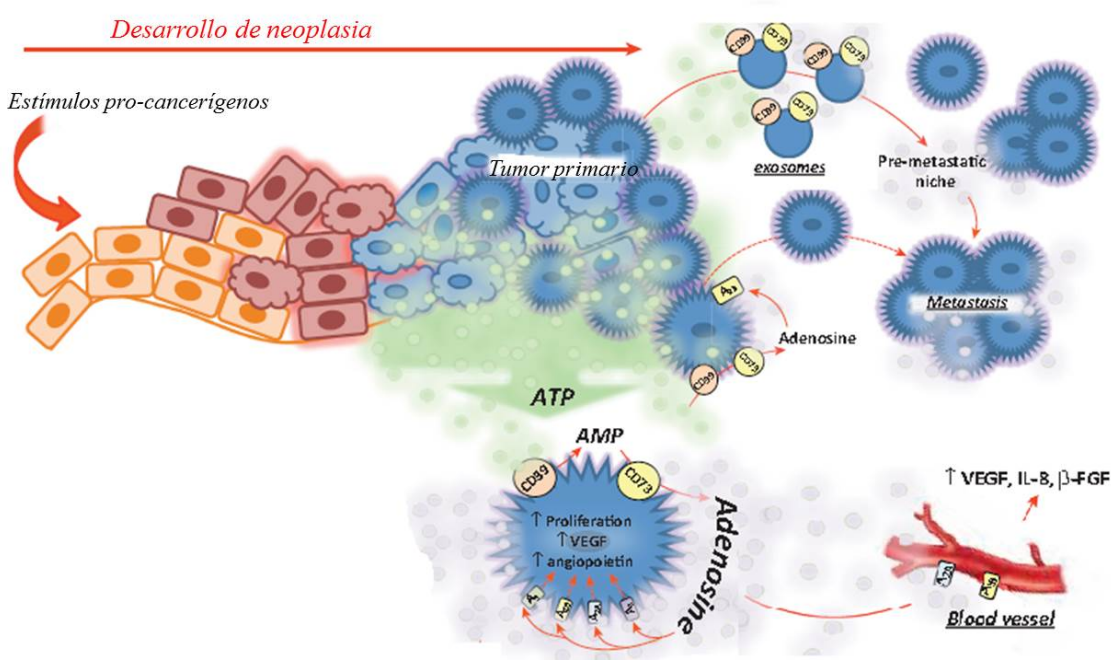


Figura 8. Desarrollo y progresión de una neoplasia con la participación de ATP y adenosina. La variedad de receptores purinérgicos existentes y su presencia en diferentes tipos de cáncer complica el estudio de los efectos del ATP y sus derivados y ocasiona confusión debido a os resultados contrarios obtenidos. En el microambiente tumoral, ATP es liberado y convertido en adenosina por la sobreexpresión de CD39 y CD73; adenosina promueve el crecimiento tumoral a través de la activación de sus cuatro subtipos de receptores lo que mejora la capacidad invasiva y metastásica de las células. Los receptores a adenosina también se encuentran en las células endoteliales y su activación desencadena la liberación de factores proangiogénicos. CD39, Ectonucleosidasa trifosfato difosfohidrolasa; CD73, ectonucleotidasa 5'; VEGF, Factor de crecimiento endotelial vascular; IL-8, interleucina 8; β-FGF, Factor de crecimiento fibroblastico beta (Antonioli, 2013).

2. Adenosina 5’- trifosfato (ATP)

El ATP es un nucleótido fundamental para la obtención de energía celular y forma parte estructural de los ácidos nucleicos; formado por la unión covalente de una pentosa (desoxirribosa), una base nitrogenada (púrica: adenina) y tres moléculas de ácido fosfórico (Morrison *et al.*, 1992).

La primera evidencia de la función de purinas como moléculas de señalización extracelular fue presentada por Alan Drury y Albert Szent-Györgyi von Nagyra-Polt en 1929, quienes mostraron que la administración intravenosa de extractos crudos de diferentes tejidos (músculo cardiaco, cerebro, riñón e hígado) provenientes de becerro y oveja ejercían múltiples efectos, por ejemplo: inducción de vasodilatación coronaria, inhibían la actividad espontánea del músculo liso, reducían la frecuencia cardiaca, entre otros, (Fig. 9).

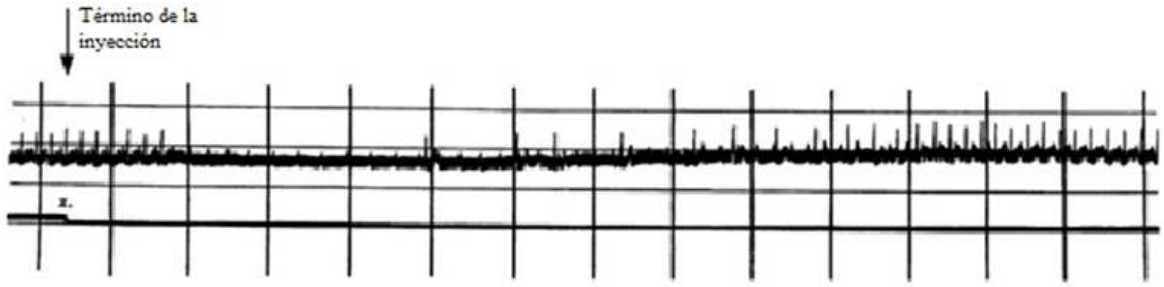


Figura 9. El primer experimento registrado de la acción de extracto de tejido cardiaco enriquecido con purinas. El electrocardiograma muestra la influencia de la inyección intravenosa de 1 ml de extracto de musculo cardiaco, la inyección comienza tres segundos antes y termina en el punto “I” (también marcado por la fecha); observamos una marcada disminución de la actividad cardiaca misma que se recupera tras 10 segundos. Marca de tiempo = 1 segundo. Modificada de Drury *et al*, 1929.

El compuesto activo en dichos extractos fue identificado como ácido adenílico (adenosina 5’-monofosfato, 5’-AMP). Además, se observó que la inyección intravenosa de adenosina y ácido adenílico mimetizan los efectos de los extractos utilizados causando bradicardia y bloqueo cardiaco (Drury *et al.*, 1929).

A partir de este trabajo pionero, cientos de artículos han sido publicados mostrando los diferentes efectos que ejerce el ATP y sus metabolitos, entre los trabajos clásicos podemos mencionar los siguientes: Gillespie quien observó que ATP era más efectivo que sus

derivados para producir bloqueo cardíaco e incrementaba el tono del músculo liso uterino (Gillespie, 1933). Emmelin y cols. mostraron que la inyección de ATP en el tercer ventrículo cerebral afectaba la neurotransmisión central y periférica provocando debilidad muscular, ataxia y somnolencia (Burnstock, 2006). Holton y Holton observaron que la estimulación eléctrica del nervio auricular de conejo aumentaba de manera transitoria los niveles séricos de ATP, lo cual supuso la presencia de ATP en las terminales nerviosas y la consideración como un neurotransmisor (Holton, 1959); en la unión neuromuscular, el ATP mostró potenciar la contracción del músculo esquelético y modular la liberación de acetilcolina (Burnstock *et al.*, 2012).

2.1. Señalización purinérgica y cáncer

El ATP y sus metabolitos han sido considerados como moléculas de señalización extracelular que al unirse a un receptor de membrana específico activan una vía de señalización particular, conocida como señalización purinérgica. Se han publicado múltiples estudios que muestran la participación de la señalización purinérgica en diferentes patologías, tales como: vejiga hiper e hipo-reactiva, alteraciones cardiovasculares, intestinales, del sistema nervioso central, diabetes, osteoporosis, falla renal, VIH, dolor y cáncer (Burnstock, 2013).

Existe un gran interés actual en el potencial terapéutico de la señalización purinérgica para el tratamiento del cáncer desde que Rapaport demostró que la adición de ATP al medio extracelular inhibía la proliferación de células tumorales, manteniéndolas estabilizadas en la fase S del ciclo celular. (Rapaport *et al.*, 1989) Estudios subsecuentes realizados tanto *in vivo* como *in vitro*, apoyan la actividad anti-proliferativa o apoptótica del ATP en diversos tipos de cáncer. (Burnstock, 2013; Farrell *et al.*, 2010; Maaser *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006) Por ejemplo, Shabbir y cols. evidenciaron que la aplicación intraperitoneal diaria de ATP a una masa tumoral consolidada de células DU145 en ratones atímicos, reducía el tamaño del tumor después de 30 días de tratamiento hasta en un 57%, la Figura 10 muestra un gráfico de la disminución progresiva del tamaño del tumor implantado y una comparación entre el ratón tratado vs el no tratado después de 60 días de aplicaciones intraperitoneales de ATP (Shabbir *et al.*, 2008).

Se ha puesto en evidencia que el ATP puede actuar de manera sinérgica cuando es administrado en combinación con agentes quimioterapéuticos o radioterapéuticos. Sin embargo, el mecanismo a través del cual el ATP actúa en estos modelos animales permanece sin elucidarse. La propuesta es que estos efectos son causados a través de los receptores específicos para ATP.

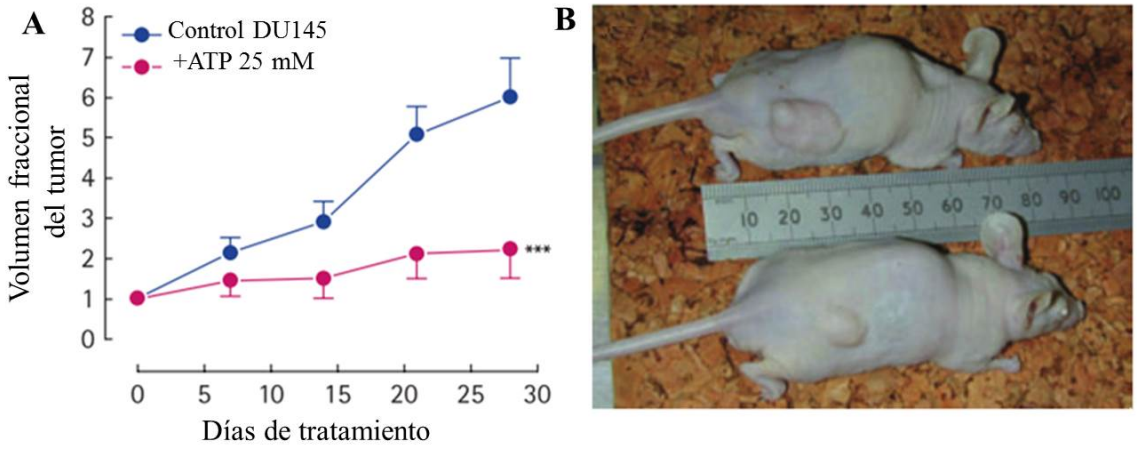


Figura 10. Efecto de la aplicación de ATP sobre el crecimiento tumoral. (a) La aplicación diaria de ATP (25 mM i.p.) significativamente reduce el crecimiento de un tumor estable de células DU145 60 días después del crecimiento inicial. (b) Efecto de ATP sobre el crecimiento de un tumor implantado de células DU145 después de 60 días del crecimiento, el ratón inferior recibió el tratamiento con ATP (Shabbir *et al*, 2008).

2.2. Receptores purinérgicos

En los años 70 se creía que ATP únicamente participaba como fuente de energía intracelular y componente de los ácidos nucleicos, la simple posibilidad de que este compuesto ubicuo y sencillo pudiera ser considerado como una molécula de señalización extracelular resultaba inverosímil ya que se desconocía, en ese momento, la existencia de receptores específicos para dicha molécula, así como transportadores o mecanismos de liberación que pudieran avalar tal función.

En 1978, Geoffrey Burnstock en su trabajo titulado: "*A basis for distinguishing two types of purinergic receptor*", propone la existencia de dos receptores a purinas: receptores P_1 para

adenosina y receptores P_2 para ATP/ADP (Burnstock, 1990). Un año después, Van Calker y cols. propusieron la existencia de dos subtipos de receptores P1, los cuales diferían en la sensibilidad mostrada por adenosina; a concentraciones submicromolares se observaba una disminución en los niveles de AMPc, mientras que a concentraciones micromolares el nivel de AMPc se incrementaba; ambos efectos eran antagonizados por metilxantinas pero no por el bloqueo de la recaptura de adenosina o por inhibición de la actividad de la fosfodiesterasa. De este modo, sugirieron nombrar a aquellos receptores que inhibían el aumento de AMPc como $A_{1,}$ y a aquellos que estimulaban la acumulación de AMPc cíclico como A_2 (Burnstock *et al.*, 2012; Van Calker, 1991).

El empleo de herramientas farmacológicas permitió a Burnstock y Kennedy proponer la existencia de dos subtipos de receptores P_2: P_2X y P_2Y. (Burnstock *et al.*, 1985) Un año después, se sugiere incluir dos subtipos más de receptores P_2, los P_2T y los P_2Z. Los receptores P_2T fueron localizados en trombocitos, plaquetas y megacariocitos respondían solamente a ADP, mientras que los receptores P_2Z se hallaban presentes en células mastoides y linfocitos y requerían de altas concentraciones de ATP (~100 µM) para ser activados (Gordon, 1986).

Años después tras el aumento de descripciones acerca de estos receptores, Abraccio y Burnstock plantearon que estos receptores deberían clasificarse, con base en su estructura molecular y mecanismos de transducción, en receptores P_2X (receptor ionotrópico, receptor ligado a canal iónico) y receptores P_2Y (receptor metabotrópico, receptor de membrana acoplado a proteínas G). (Burnstock, 2009)

En la Figura 11 apreciamos los miembros dela familia de receptores purinérgicos que actualmente se reconocen con dos clases de receptores: P_1 y $P_{2;}$ dentro de la clase de receptores P_1 se han descrito 4 subtipos y del grupo P_2 dos subclases: P_2X y P_2Y, siete subtipos de receptores P_2X y ocho subtipos del receptor P_2Y.

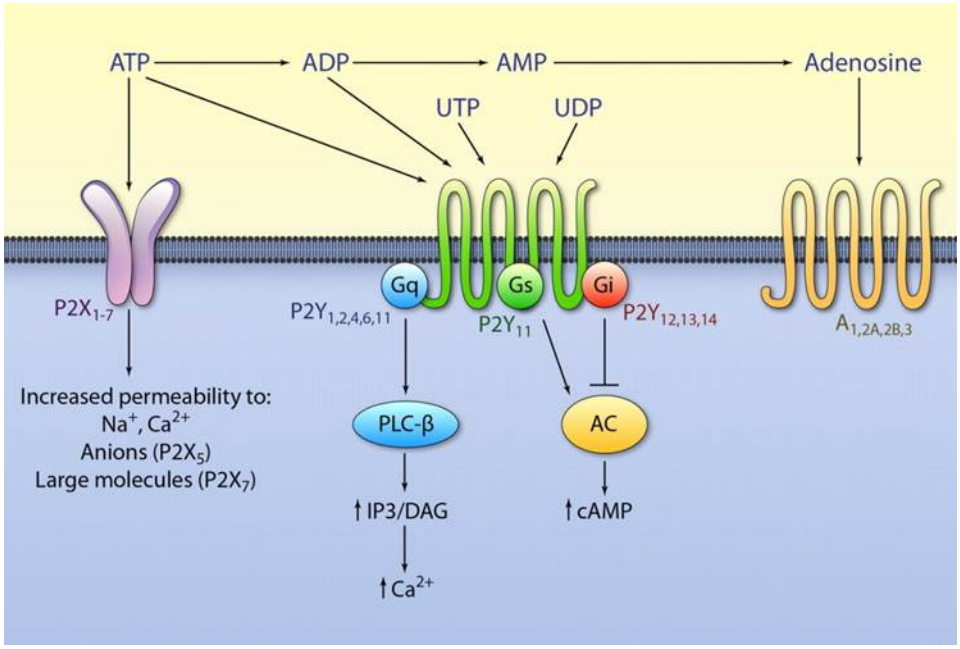


Figura 11. Clases de receptores purinérgicos. Los receptores purinérgicos son una gran familia que se activan al entrar en contacto con alguna purina, así existen dos clases de receptores P_1 y P_2; los primeros de ellos sensibles a adenosina y similares en estructura a los receptores acoplados a proteínas G, cuatro miembros forman esta clase (A_1, A_{2A}, A_{2B}, A_3). Los receptores P_2se activan en presencia de ATP o ADP, hay dos subtipos reconocidos: P_2X y P_2Y, receptores ionotrópicos y metabotrópicos, respectivamente. El subtipo P_2X posee 7 subunidades (1-7) hasta ahora descritas mientras que P_2Y posee ocho subunidades descritas para humano. Se ilustran sus principales respuestas a la activación del receptor. AC, adenilato ciclasa; PLC, fosfolipasa C; IP3, inositol trifosfato; DAG, diacil glicerol (Yang, 2012).

2.2.1. Receptores Purinérgicos P_1

Cuatro diferentes subtipos del receptor P_1, han sido clonados y caracterizados: A_1, A_{2A}, A_{2B}, A_3; los cuatro miembros pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G semejantes a rodopsina; la Figura 12 ejemplifica la estructura básica de estos receptores con un extremo N- terminal relativamente corto (7-13 aminoácidos de longitud), a diferencia de su extremo COOH- terminal (32-120 residuos). Los receptores P_1 están acoplados a la enzima adenilato ciclasa, los receptores A_1 y A_3 inhiben la actividad de dicha enzima a través de la subunidad α de proteínas $G_{i/o}$, mientras que los receptores A_{2A} y A_{2B} estimulan la producción de AMPc a través de la subunidad α una proteína G_s (Burnstock *et al.*, 2012).

2.2.2. Receptores purinérgicos P_2

Los receptores P_2, tanto P_2X como P_2Y poseen una distribución ubicua, lo que les permite participar en diversas respuestas celulares desde proliferación, metabolismo, diferenciación, apoptosis, transducción de señales, expresión de genes y plasticidad neuronal, etc., tal y como lo muestra la Tabla 1 (Burnstock, 2009).

La clonación molecular ha permitido identificar que cada subclase de receptores P_2X y P_2Y está conformado por varios subtipos de receptores, con características muy particulares (Burnstock *et al.*, 2004).

Receptor	Subtipo	Distribución principal	Mecanismos de transducción
P2X	P2X1	Músculo liso, plaquetas, cerebelo, neuronas del asta dorsal.	Canal catiónico intrínseco (Ca2+ y Na+)
	P2X2	Músculo liso, SNC, retina, células cromafínes, ganglios sensoriales y autonómicos.	Canal catiónico intrínseco (particularmente Ca2+)
	P2X3	Neuronas sensoriales, NTS, algunas neuronas simpáticas	Canal catiónico intrínseco
	P2X4	SNC, red de testis, colon.	Canal catiónico intrínseco (especialmente Ca2+)
	P2X5	Células proliferadoras de la piel, intestino, vejiga, timo, médula espinal.	Canal catiónico intrínseco
	P2X6	SNC, neuronas motoras en la médula espinal.	Canal catiónico intrínseco
	P2X7	Células apoptóticas del sistema inmune, páncreas, piel, etc.	Canal catiónico intrínseco y poro con prolongada activación
P2Y	P2Y1	Células epiteliales y endoteliales, plquetas, células inmunes, osteoclastos.	Gq/G11; activación de fosfolipasa Cβ
	P2Y2	Células inmunes, células epiteliales y endoteliales, túbulos renales, osteoblastos.	Gq/G11 y posiblemente Gi; activación de fosfolipasa Cβ
	P2Y4	Células endoteliales, corazón.	Gq/G11 y posiblemente Gi; activación de fosfolipasa Cβ
	P2Y6	Algunas células epiteliales, placenta, células T, timo.	Gq/G11; activación de fosfolipasa Cβ
	P2Y11	Bazo, intestino, granulocitos.	Gq/G11 y posiblemente Gs; activación de fosfolipasa Cβ
	P2Y12	Plaquetas, células gliales.	Gi (2); inhibición de adenilato ciclasa
	P2Y13	Bazo, cerebro, nódos linfáticos,	Gi

	médula ósea.	
P2Y14	Placenta, tejido adiposo, estómago, intestino, cerebro.	Gi/o

Tabla 1. Distribución y mecanismo de transducción de la señal de los diferentes subtipos de los receptores purinérgicos, P_2. Modificada de Burnstock *et al.*, 2004.

2.2.2.1. Receptores Purinérgicos P_2Y

Actualmente se han descrito ocho subtipos de receptores P_2Y en el humano: P_2Y1, P_2Y_2, P_2Y_4, P_2Y_6, P_2Y_{11}, P_2Y_{11}, P_2Y_{13} y P_2Y_{14}; los números no incluidos en la secuencia representan receptores ortólogos presentes en no mamíferos o son receptores que presentan homología con los receptores P_2Y pero que hasta la fecha no hay evidencia de su funcionalidad. Estudios filogenéticos y estructurales permitieron la distinción de los receptores P_2Y en dos grupos, el primero incluye los subtipos $P_2Y_{1, 2, 4, 6, 11}$, estos receptores están acoplados a proteínas G que tienden a incrementar los niveles de inositol trifosfato (IP_3) y calcio citosólico, empero la activación del receptor P_2Y_{11} estimula la actividad de la adenilato ciclasa, elevando los niveles citosólicos de AMPc e IP_3; el segundo grupo lo comprenden los subtipos $P_2Y_{12, 13, 14}$ cuya activación desencadena la inhibición de la producción de AMPc. La cascada de señalización activada por los receptores P_2Y involucra en su fase final la fosforilación de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), asociadas a la regulación de la expresión génica (Abbracchio *et al.*, 2003; Burnstock, 2007; Burnstock *et al.*, 2012).

Los genes de los receptores P_2Y no contienen intrones en su secuencia excepto P_2Y_{11}. La estructura de cada receptor P_2Y está conformada por siete hélices α transmembranales, las cuales forman el nicho de interacción con el agonista; el dominio N-terminal se encuentra en la parte extracelular mientras que el dominio C- terminal se ubica intracelularmente, ambos glicosilados y con posibles sitios de unión para proteínas cinasas; alto nivel de homología entre las secuencias en puntos clave (dominios transmembranales 3,6 y 7), finalmente el dominio C-terminal posee una gran diversidad estructural entre los receptores, lo que influye el grado y tipo de interacciones con proteínas G (Burnstock *et al.*, 2012).

2.2.2.2. Receptores purinérgicos P_2X

Los receptores P_2X pertenecen a la familia de receptores ionotrópicos, también conocidos como canales activados por ligando.

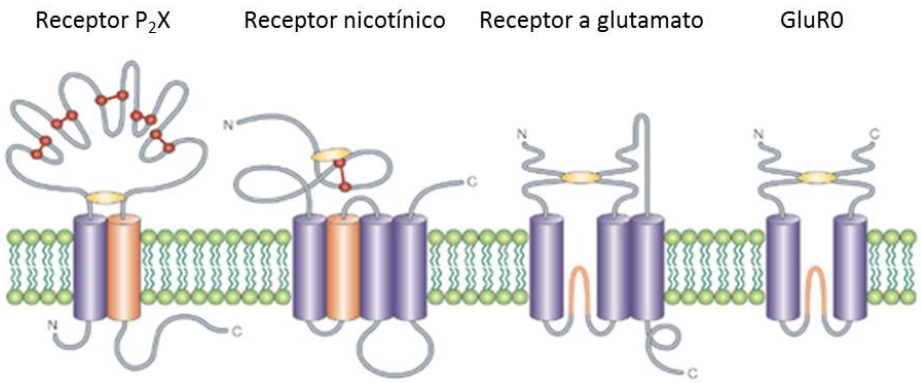


Figura 12. Familia de receptores inotrópicos. Los purinoreceptores (receptores P2X triméricos; cada subunidad esta ensamblada por dos dominios transmembrana), los receptores a glutamato (receptores tetraméricos (AMPA, kainato y NMDA; cada subunidad se encuentra ensamblada por tres dominios transmembrana), y los receptores pentaméricos para acetilcolina, GABA, glicina y serotonina (cada subunidad está compuesta de cuatro dominios). Los receptores a glutamato y los receptores P2X de vertebrados son canales catiónicos no selectivos, mientras los receptores pentaméricos son canales catiónicos no selectivos y canales de cloro. Se muestra el recién identificado GluR0 en cianobacterias, posee dos dominios transmembrana, al unir glutamato forma un canal selectivo a K^+ (Khakh, 2001).

Los integrantes de esta familia se encuentran esquematizados en la Figura 12, formada por tres clases de canales iónicos que difieren en el número de subunidades y de segmentos transmembranales que conforman en canal. La primer clase representa a los canales iónicos activados por ligando que poseen una conformación pentamérica donde cada subunidad posee cuatro segmentos transmembranales y que permiten el paso tanto de cationes como aniones, entre los elementos más representativos tenemos los receptores para acetilcolina, GABA, glicina y serotonina; la segunda clase corresponde a los receptores a glutamato, estructuras tetraméricas y con tres segmentos transmembranales por subunidad; a la tercera clase pertenecen los receptores ionotrópicos activados por ATP (P_2X), conformados por tres subunidades y con dos segmentos transmembranales por subunidad (Burnstock *et al.*, 2012).

Todos los receptores P_2X son canales permeables a cationes Na^+, K^+ y Ca^{+2}. Los receptores a ATP, comparten estructura (dos segmentos transmembranales por subunidad) con otros canales iónicos no dependientes de voltaje, como los canales de sodio epiteliales (ENaC), canales mecanosensibles, degenerinas y canales iónicos sensibles a ácido (ASIC), lo cual sugiere un antecesor común para ellos (Burnstock *et al.*, 2012; Burnstock, 2009).

Cada subtipo de receptor P_2X es codificado por genes diferentes. El gen que codifica para la subunidad P_2X_7 se localiza en el cromosoma 12q24, junto con el gen que codifica para la subunidad P_2X_4, existiendo una separación de solamente 23,492 pares de bases entre ellos, esta cercanía podría indicar duplicación genética, ya que su secuencia de aminoácidos es muy parecida. Todas las subunidades de los receptores P_2X presentan 13 exones y 11 intrones, lo cual asegura la existencia de variantes (North, 2002).

La clonación de los siete ADNc de los integrantes de la clase de receptores tuvo diversos sustratos, los números para los receptores se asignaron de acuerdo a la secuencia histórica de clonado; P_2X_1 fue clonado a partir de los conductos deferentes, cuando fue expresado en ovocitos de *Xenopus leavis* y en otras líneas celulares, el ADNc transfectado fue capaz de formar un canal funcional activado por ATP con propiedades similares a la corriente activada por ATP en los conductos deferentes; P_2X_2 a partir de células PC12 de rata; P_2X_3 fue clonado del ganglio dorsal de rata, además se encontró que la coexpresión de P_2X_2 y P_2X_3 formaba un canal heterotrimérico con propiedades que correspondían al receptor nativo en neuronas sensoriales; P_2X_4 fue clonado de distintas partes: ganglio cervical superior de rata, cerebro de rata e islotes pancreáticos; P_2X_5 fue clonado a partir de corazón y ganglio celiaco de rata; P_2X_6 de cerebro de rata y ganglio cervical superior de pollo; P_2X_7 fue clonado de cerebro y ganglio cervical superior de rata, demostrando la presencia ubicua de esta clase de receptores en el humano y rata (Burnstock *et al.*, 2012).

2.2.3. Receptores purinérgicos P_2 y cáncer

Estudios *in vitro* de la señalización purinérgica en cáncer han intentado determinar cuáles de los subtipos de receptores P_2 pudieran estar presentes en células tumorales, los efectos que su activación pueda desencadenar y los mecanismos para ejercer dichos posibles efectos. La señalización purinérgica ha sido estudiada en múltiples tipos de cáncer:

colorectal, leucemia, esofageal, cervical, de próstata, etc.; demostrando que pueden alterar el crecimiento de cultivos primarios y de líneas celulares tumorales (Burstock, 2013).

Un amplio rango de técnicas moleculares y celulares (tabla 2) han sido empleadas con el objetivo de crear perfiles de expresión de los receptores P_2 a nivel de proteína (inmunocitoquímica, inmunofluorescencia y Wester Blot) y de ARNm (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa, RT-PCR; Nother Blot); así como determinar sus respuestas funcionales a ATP en diferente tipos de cáncer (ensayos de apoptosis y medición intracelular de calcio), (Deli *et al.*, 2008; White *et al.*, 2006).

Tipo de cáncer	Línea celular	ARNm	Proteína	2° mensajero/ respuesta funcional	Cambio en el número de células
Melanoma	A375	P2X7	P2X7	Caspasa-3,-7	↑ P2Y2
		P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6	P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6	FLC- media cambios en $[Ca^{+2}]_i$	↓P2Y1, P2X7
Piel (carcinoma de células escamosas)	A431	No investigado	P2X5, P2X7	Caspasa-3, TUNEL	↑ P2Y2
				PCNA	↓ P2Y1, P2X5,P2X7
			P2Y1, P2Y2		
Colorectal	HT29	P2X1, P2X4, P2X5, P2X7	P2X1, P2X4, P2X7	$[Ca^{2+}]i$	↓↑ P2Y2
	HCT8	P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6	P2Y1, P2Y2	Muerte celular, ELISA	↓P2Y1, P2X7
	CaCo-2				
Esófageal	Kyse-140	P2X4, P2X5	P2Y2	Caspasa-3	↓ P2Y2
		P2Y2		FLC- media cambios en $[Ca^{+2}]_i$, TUNEL	
Pulmón	A459	P2Y2, P2Y6	No investigado	CAMKII, NF-κB	↑P2Y2, P2Y6
Próstata	PC3	P2X4, P2X5, P2X7	P2X4, P2X5, P2X7	FLC- media cambios en $[Ca^{+2}]_i$, TUNEL	¿P2Y2?
	DU145	P2Y1, P2Y2, P2Y6, P2Y11	P2Y2		↓P2X5, P2X7
Tumores cerebrales	1321N1	P2Y1, P2Y12	P2Y1	Caspasa-3	↓↑ P2Y1
	C6			ERK	↑ P2Y12
	U-251MG			FLC- media cambios en $[Ca^{+2}]_i$	
	U138-MG				

	U-87MG			Adenilato ciclasa, G_i	
Cervical	CaSki	No investigado	P2X4, P2X7	Caspasa-9, TUNEL	↓ P2X7
			P2Y2		
Mama	MCF-7	P2Y2	P2X7	$[Ca^{+2}]_i$	↑ P2Y2
	Hs578T	P2X7		$[K^+]_i$	
	SK-Br3				
	T47-D				
	MDA-MB231				
Ovario	OVCAR-3	P2Y2	No investigado	$[Ca^{+2}]_i$	↓ ↑P2Y2
	EFO-21				
	EFO-27				
Endometrio	HEC-1[a]	P2Y2	No investigado	FLC- media cambios en $[Ca^{+2}]_i$	↑ P2Y2
	Ishikawa				
Neoplasias hematológicas	HL-60	P2X7	P2X7	$[Ca^{+2}]_i$	↓ P2X7
	NB-4	P2Y11		Adenilato ciclasa, PKA	
Vejiga (TCC)	HT-1376	No investigado	No investigado	No investigado	↓P2Y11, P2X4, P2X5
Toroide	ARO	P2Y1, P2Y2	No investigado	FLC- media cambios en $[Ca^{+2}]_i$	↑P2Y1, P2Y2

Tabla 2. Expresión de los subtipos de receptores P2 en diferentes tipos de cáncer. CaMKII, calmodulina dependiente de la proteína cinasa II; ERK, cinasa regulada por señalización extracelular; NF-kB, factor nuclear κB; PCNA, antígeno nuclear de células proliferando; PKA, proteína cinasa A; PLC, fosfolipasa C; TUNEL, método de detección de fragmentación nuclear. Modificado de White *et al*, 2006.

Hasta el momento, cinco subtipos de receptor P_2 han sido primordialmente implicados en la inhibición del crecimiento de células cancerígenas, ellos son: P_2X_5, P_2X_7, P_2Y_1, P_2Y_2 y P_2Y_{11}. El receptor P_2Y_1 disminuye la tasa de proliferación en melanoma; la estimulación del receptor P_2Y_2 resulta en muerte apoptótica de las células en cáncer colorectal mientras que los receptores P_2X median eventos que resultan en la inhibición de crecimiento. El receptor P_2X_7 es el más ampliamente aceptado como receptor purinérgico mediador de muerte celular por apoptosis o necrosis, inicialmente sugerido por experimentos en tumores desarrollados a partir de líneas celulares cancerígenas implantadas en ratones, donde ATP indujo muerte celular por apoptosis o necrosis, dependiendo de la línea celular. La Figura 13 representa los mecanismos de acción propuestos por los cinco subtipos de receptores P_2

hasta ahora involucrados en la alteración negativa de las funciones de las células

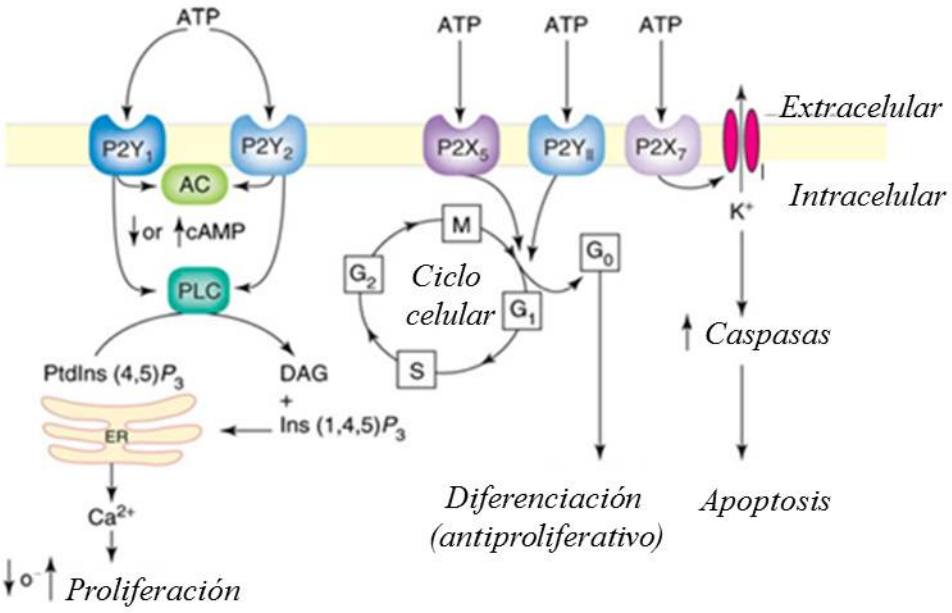


Figura 13. Diferentes mecanismos de los receptores P_2 que alteran la función de las células cancerígenas. Los receptores P_2Y_1 y P_2Y_{11} pueden afectar la tasa de células proliferando por modulación de la actividad de la adenilato ciclasa (AC) y alterar los niveles intracelulares de AMPc, o por decremento de los niveles intracelulares de calcio, a través de la vía de la fosfolipasa c (PLC). La activación de los receptores P2X5 y P2Y1 podrían funcionar como interruptor del ciclo celular de un estado de proliferación hacia uno de diferenciación. El receptor P2X7 activa la vía apoptótica por activación de la vía de las caspasa. DAG: diacilglicerol; Ins (1,4,5)P3: inositol (1,4,5)-trifosfato; Ptdlns (4,5)P2: fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (White *et al.*, 2006).

cancerígenas (Farrell *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2004; White *et al.*, 2006).

2.2.4. Receptor P_2X_7

El receptor P_2X_7, inicialmente identificado como P_2Z, se encuentra presente en varios tipos de macrófagos periféricos y linfocitos. Se han descrito hasta el momento ocho variantes del receptor P_2X_7, designándose como P_2X_7A-H, siendo la variante A la forma original que contiene la secuencia de aminoácidos completa (595 aminoácidos). La variante P_2X_7B incluye un intrón de paro entre los exones 10 y 11, lo que provoca la pérdida de los últimos 171 aminoácidos, y una ganancia de 18 aminoácidos en el segundo dominio transmebranal. Las variantes P_2X_7C al P_2X_7F no incluyen algunos exones que codifican para regiones del

domino extracelular; las variante P_2X_7C, P_2X_7E y P_2X_7G incluyen también el mismo intrón de la variante P_2X_7B. Las variantes P_2X_7G y P_2X_7H contienen un exón adicional (N3), el cual introduce un nuevo codón de paro que resulta en la pérdida del primer dominio transmembranal. Así, cuatro de las siete variantes de P_2X_7 presentan un alterno y corto extremo carboxilo terminal (Sluyter & Stokes, 2011).

Tres variantes adicionales de P_2X_7 han sido descritas, P_2X_7I resultado de una mutación puntual entre los exones 1 y 2; P_2X_7J carece del exón 8 lo que resulta en una proteína truncada de solo 258 aminoácidos; y P_2X_7K aparece por la adición de un exón (exón '1') en el intrón entre los exones 1 y 2, resultando en un extremo amino terminal y primer dominio transmenbranal alternativos, muestra una mayor sensibilidad por el agonista y tendencias a formar un poro (Sluyter & Stokes, 2011).

2.2.4.1. Estructura molecular y tridimensional

El receptor P_2X_7 comparte con todas las subunidades P_2X una estructura terciaria con dos regiones hidrofóbicas (dominios transmembranales α-hélice: dominio 1 y 2, TM1 y TM2), lo suficientemente largas como para atravesar la membrana plasmática; estas regiones hidrofóbicas se encuentran separadas por la mayor parte del péptido: una gran asa extracelular; el extremo amino terminal y carboxilo terminal son intracelulares. La subunidad del receptor P_2X_7 presenta la siguiente topología:

- Extremo NH-terminal (1-25 aa), se encuentra intracelularmente; es capaz de formar complejos con integrinas, cinasas asociadas a la membrana, proteínas de choque térmico.
- Primer segmento transmembranal (26-46 aa).
- Dominio extracelular (47-334 aa), presenta cinco sitios para N-glicosilaciones, una característica peculiar en esta región es la presencia de 22 residuos altamente conservados filogenéticamente y la existencia de diez residuos de cisteína, lo cual sugiere la formación de puentes disulfuro. La presencia de regiones hidrofóbicas cercanas al poro vestibular están involucradas en la modulación del flujo de cationes.

- Segundo segmento transmembranal (335-355 aa).
- Extremo COOH-terminal (356-595 aa), es la región que muestra mayores diferencias entre las diversas variantes del receptor P_2X_7, requerido para la formación del poro, se involucra con el tráfico y la expresión del receptor en la membrana; en células epiteliales, los residuos en las posiciones 582-587 determinan el destino del receptor sobre la membrana basolateral. Alterar la composición o la longitud del extremo COOH terminal modula la cinética de la corriente activada por ATP, así como la desensibilización y la permeabilidad.

El receptor P_2X_7, así como los demás receptores P_2, necesitan de ATP para activarse; el análisis de la dependencia de concentración de ATP para provocar corrientes iónicas, demostró que la activación del receptor requiere la unión de tres moléculas de ATP. (Bean, 1990) La naturaleza del sitio de unión a ATP ha sido analizado en numerosos estudios de mutación, proponiéndose que las cargas negativas de los grupos fosfatos del ATP podrían interactuar con los residuos de lisina positivamente cargados ubicados en los dominios transmembranales, de esta manera el sitio de unión es formado por dos subunidades adyacentes, una sola molécula de ATP se une a dos subunidades del receptor. (Evans, 2009)

Además, experimentos de mutagénesis dirigida identificaron ocho residuos conservados críticos para la sensibilidad del receptor a ATP; juntos formarían una “bolsa”, la cual gracias a las cargas positivas atrapan la molécula de ATP (Browne *et al.*, 2010).

Estudios cristalográficos del receptor P_2X_4 detallaron la estructura tridimensional de la subunidad presentando una forma ingeniosamente definida de “delfín saltando”, cuya representación se muestra en la Figura 14 con los segmentos transmembranales conformados por α-hélices que se extienden cerca de 28 Å a través de la membrana plasmática; la mayor parte del receptor es el asa extracelular, la cual sobresale ~ 70 Å. El segmento extracelular contiene múltiples cadenas β que son sustrato de interacciones con otros elementos de la misma subunidad; existen pocas interacciones en y alrededor de la región transmembranal (TMR), lo que permite movilidad relativa con respecto al otro TMR cuando el ATP se una y abra el poro. En el estado cerrado el canal está bloqueado por varios residuos (principalmente hidrofóbicos) posicionados en el segmento transmembranal α-hélice (Browne *et al.*, 2010; Kawate *et al.*, 2009).

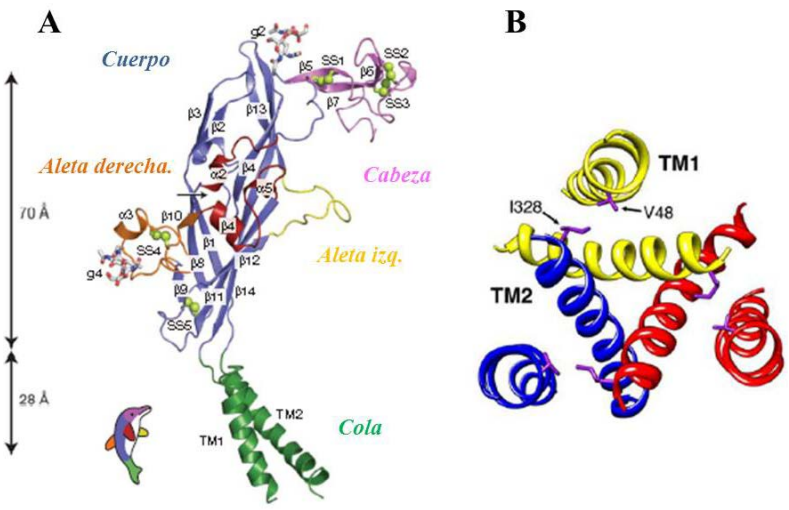


Figura 14. Modelo de la estructura de una subunidad P_2X_4. A, una subunidad P_2X_4 presenta una forma de delfín con los dominios transmembranales (TM1-2) insertados en la membrana (cola) y el asa extracelular formando el cuerpo del delfín. B, vista superior de un receptor P_2X con tres subunidades ensambladas para formarlo; en una vista lateral el canal simula un cáliz, los TM2 forman las paredes del poro (Browne, 2010; Kawate, 2009).

2.2.4.2. Ensamble trimérico

Para la funcionalidad del receptor P_2X_7 y de todos los integrantes de la clase P_2X es necesaria la formación de un ensamble trimérico, datos indican la posibilidad de ensamble homo y heterotrimérico entre las subunidades (Burnstock, 2009).

	$P2X_1$	$P2X_2$	$P2X_3$	$P2X_4$	$P2X_5$	$P2X_6$	$P2X_7$
$P2X_1$	+	+	+	−	+	+	−
$P2X_2$		+	+	−	+	+	−
$P2X_3$			+	−	+	−	−
$P2X_4$				+	+	+	−
$P2X_5$					+	+	−
$P2X_6$						−	−
$P2X_7$							+

Tabla 3. Ensamble de trimérico posible de las diversas subunidades para la formación de un receptor P_2X (Torres *et al*, 1999).

Todas las subunidades, con excepción de la subunidad P_2X_6 forman receptores funcionales cuando se expresan en sistemas homólogos y heterólogos. La tabla 3, muestra que la subunidad P_2X_7 no es capaz de ensamblarse con otras subunidades, mientras que la subunidad P_2X_5 puede ensamblarse con cualquier otra subunidad aumentando su variabilidad estructural y funcional. (Torres *et al.*, 1999) Sin embargo, evidencias recientes demuestran que la subunidad P_2X_7 puede formar receptores heteroméricos funcionales (Fig. 15**)** (Guo *et al.*, 2007).

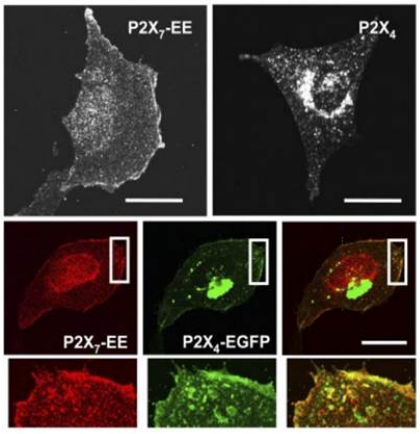


Figura 15. Coexpresión de la subunidad P_2X_4 y P_2X_7, incrementa la cantidad de P_2X_4 presente en la membrana. Células NRK fueron transfectadas con P_2X_7 o P2X4 por separado (arriba); o coexpresados con P_2X_7/ P_2X_4-EGFP (abajo). Se observa una zona de sobreposición en las células que coexpresaron ambas subunidades (Guo *et al.*, 2007).

Las subunidades se agrupan en una envoltura para dar forma al trímero, uno alrededor del otro para crear una estructura similar a un cáliz (Browne *et al.*, 2010; Kawate *et al.*, 2009).

El receptor P_2X_7 es el miembro más distinto estructuralmente y funcionalmente de la clase de receptores P_2X, posee diversas características especiales pero la más peculiar es que se encuentra asociado a la formación de un gran poro permeable a cationes y moléculas de alto peso molecular. Similar a los otros canales P_2X, el receptor P_2X_7 se ensambla como un trímero; sin embargo sus propiedades biofísicas y farmacológicas son completamente distintas a las del resto de la familia; el receptor P_2X_7 solamente puede ser activado en presencia de altas concentraciones de ATP (>1,000 μM), su sensibilidad al agonista aumenta con la disminución de la concentración de cationes divalentes en el medio extracelular. Los marcadores biofísicos de este receptor son: baja sensibilidad a ATP la cual incrementa sustancialmente (en orden de 1) en soluciones libres de cationes divalentes, alta sensibilidad a Bz-ATP y un complejo comportamiento de corriente tras una estimulación prolongada. Esta característica se manifiesta en un gradual incremento de la permeabilidad a cationes de alto peso molecular, la cual eventualmente resulta en la formación e un poro

transmembrana permeable a grandes moléculas de alrededor de 500 a 900 Da. La formación del poro está asociada directamente con la permeabilidad celular y con el proceso de apoptosis (Burnstock *et al.*, 2012).

La activación de este receptor está asociada a múltiples procesos y a varias cascadas de señalización, desde activación de caspasas, activación de fosfolipasas, producción de radicales libres, distintas formas de secreción, modificaciones al citoesqueleto, regulación del ciclo celular, etc. La primera evidencia de que la activación del receptor inducía cambios en la morfología celular fue hecha en células HEK293, tras una estimulación prolongada (30 seg.) con Bz-ATP se comenzaron a desarrollar "burbujas" sobre la membrana celular; esta burbujas aparecían como protusiones en forma de hemiesfera con un diámetro de entre 1 a 10 µm de diámetro, además de la presencia de vesículas (1 µm de diámetro aprox.) que se desprendían de la célula, la estimulación continua llevaba a la célula a la muerte. Estas microvesículas mostraron contener IL-1β (Burnstock *et al.*, 2012).

La idea de un receptor de membrana ligado a la muerte celular resulta una idea atractiva para el tratamiento del cáncer. La presencia del receptor P_2X_7 hasta ahora, se ha descrito en al menos cinco diferentes tipos de cáncer; empleando la técnica de TUNEL y ensayos de actividad de las caspasas, se ha demostrado la funcionalidad del canal y su participación antitumoral vía apoptosis (Sluyter *et al.*, 2011).

Análisis del efecto del receptor P_2X_7 sobre el crecimiento tumoral se hace más compleja debido a las observaciones que una estimulación tónica, opuesta a una estimulación farmacológica, puede estimular eventos tróficos como el crecimiento celular en vez de un efecto citotóxico. Además del crecimiento celular, evidencias de estudios *in vitro* e *in vivo* muestran que el receptor P_2X_7 podría participar también en la diseminación metastásica. (Burnstock, 2013)

Planteamiento del problema

Se sabe que la presencia de ATP en el medio extracelular inhibe la proliferación celular de diferentes tipos de cáncer, por lo que resultaría importante conocer si este efecto se presenta en una línea celular de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231) y si este efecto se debe a la activación del receptor purinérgico P_2X_7, asi como el mecanismo molecular involucrado

Pregunta de investigación

¿Podrá, la presencia de altas concentraciones ATP en el medio extracelular modificar la capacidad proliferativa de línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231?

Hipótesis

La activación del receptor P_2X_7 por ATP altera la capacidad proliferativa de la línea celular de cáncer de mama, MDA-MB 231

Objetivos

- General
    - Determinar, si la activación del receptor P_2X_7 altera la capacidad proliferativa de la línea celular de cáncer de mama, MDA-MB 231.

- Específicos
    - Realizar una curva dosis-efecto a ATP extracelular sobre la proliferación de la línea celular de cáncer de mama, MDA-MB-231.
    - Analizar el curso temporal del efecto del ATP extracelular sobre la proliferación de la línea celular de cáncer de mama, MDA-MB-231.
    - Detallar el perfil de expresión de los receptores purinérgicos P_2X y P_2Y en la línea celular de cáncer de mama, MDA-MB-231.
    - Demostrar la presencia del ARN mensajero que codifica para el receptor P_2X_7 en la línea celular de cáncer de mama, MDA-MB-231.

Material y métodos

1. Cultivo celular

Para todos los ensayos experimentales se utilizaron células MDA-MB 231, provenientes de adenocarcinoma de mama grado III. Dos líneas celulares más fueron empleadas: MCF-7, y MCF-10A, línea celular epitelial humana de mama y línea celular humana de carcinoma mamario

1.1. Cultivo de la línea celular tumoral, MDA-MB-231

Las células fueron sembradas en matraces de cultivo de poliestireno de 25 cm^2 de superficie para permitir su crecimiento en monocapa, con medio de cultivo RPMI Advanced-GI1640 suplementado con 3% de suero fetal bovino (SFB), 1% de L-glutamina y 1% de una mezcla de antibiótico-antimicótico (anfotericina B, estreptomicina y penicilina). Posteriormente las células fueron transferidas a una incubadora a 37^0C con una atmósfera de húmeda de 5% de CO_2 y 95%; el medio de cultivo se renovó cada 48 h y cada 7 días, las células fueron sometidas a un proceso de tripsinización, regido por el siguiente protocolo: se retiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados consecutivos con buffer de fosfatos (PBS) estéril; con el fin de despegar las células del sustrato del matraz, se les añadió 2 ml de tripsina al 0.25% durante cinco minutos, después 4 ml de medio de cultivo se añadieron y se procedió a la re-suspensión mecánica utilizando una pipeta de vidrio. La suspensión celular fue transferida a un tubo cónico de 15 ml y centrifugada a 1,200 rpm durante 5 minutos, por último, se eliminó el sobrenadante y la pastilla así obtenida fue re-suspendida en medio de cultivo fresco, a partir del cual, se tomaron alícuotas para regenerar el cultivo madre y sembrar las células para los experimentos posteriores.

2. Tinción con cristal violeta

Tras someter a la línea celular MDA-MB-231 al tratamiento con ATP, las células fueron lavadas dos veces con PBS 1x no estéril, seguidos de la fijación durante 30 minutos con una solución metanol/acetona en una proporción 1:1 a 4°C; al terminar la fijación, se retiró la solución fijadora y se incubo a las células con el colorante cristal violeta durante 20

minutos a temperatura ambiente; finalizada la tinción, se realizaron lavados con agua desionizada para eliminar los restos de colorante (aproximadamente tres lavados); hasta la obtención de la fotografías, las muestras se mantuvieron refrigeradas e hidratadas con agua desionizada.

3. Ensayo de expresión génica

El ensayo de expresión génica se llevó a cabo mediante la cuantificación relativa de los transcritos expresados mediante análisis de RT-PCR, la manipulación del ARN en todo momento tuvo lugar en condiciones libres de ARN asas.

3.1. Extracción de ARN

Las células MDA-MB-231 fueron sembradas en placa de 35 mm, cuando alcanzaron una confluencia aproximada del 80%, siguiendo las instrucciones del kit comercial para extracción de ARN *"ZR RNA MiniPrep (Zymo Research)"*: se aspiró el medio de cultivo y se lavó dos veces con PBS 1x no estéril, al terminar los lavados, se agregó 500 µL de buffer de lisis y, tras dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente, el contenido de la placa se transfirió a una columna colocada dentro de un tubo colector. La columna fue centrifugada durante 3 minutos a 12,000 rpm, al finalizar se retiró el contenido del tubo colector; con el objetivo de purificar el ARN, la muestra fue sometida a lavados independientes con las soluciones del kit en el orden siguiente: buffer de prelavado, buffer de lavado (dos veces); tras cada lavado, la muestra se centrifugo a 12,000 rpm durante 5 minutos y se retiró el contenido del tubo colector en todo momento. Por último, la columna fue transferida a tubo de 1.5mL estéril y se añadieron 50 µL de agua libre de ADN asas y RNA sas para eluir el ARN contenido en el filtro de la columna, se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrífugo a 12,000 rpm por 5 minutos, la columna fue desechada y el filtrado fue incubado durante 5 minutos a 60°C.

3.2. Cuantificación de ARN

La concentración de ARN contenido se determinó mediante el uso de un fotómetro *"Biophotometer (Eppendorf)"*, mediante una dilución de 4 µL de la muestra con 196 µL de

agua para PCR obteniendo un volumen final de 200 µL; la concentración fue medida a una longitud de onda 260 nm y la integridad del ARN se evaluó como cociente obtenido entre la absorbancia obtenida a 260 nm y a 280 nm (A260/A280), el valor del cociente se ubicó en el rango 1.5-2 para considerarse como una muestra de ARN de calidad.

3.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa con transcripción inversa (por sus siglas en inglés, RT-PCR)

Para la síntesis de la primera cadena de ADN (ADNc) se empleó el kit comercial "*High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)"*, siguiendo las indicaciones del fabricante, se elaboró un mix "master" para tubos de reacción con un volumen final de 20 µL (**Tabla 4**).

Reactivo	**µL**
Buffer RT	2
dNTP´s	0.8
Iniciadores aleatorios	2
Transcriptasa reversa (MuL)	1
Agua	3.2
Volumen final	9

Tabla 4. Componentes de un tubo de reacción para la RT-PCR.

El volumen restante (11 µL) fue completado con el ARN de la muestra más agua, calculando una concentración de 2 µg en 20 µL.

Los tubos de reacción se colocaron en un termociclador "*Mastercycler gradiente (Eppendorf)"*, para someterlos al siguiente protocolo: 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C, 10 minutos a 87°C, finalmente la temperatura de los tubos se redujo a 4°C, para ser almacenados en congelación hasta su empleo.

El ADNc obtenido se amplifico mediante PCR en modalidad semi-cuantitativa, con la finalidad de evaluar los niveles de expresión de ARN mensajero (ARNm) de diversos oligonucleótido de interés.

Empleando el kit comercial *"Dream Taq PCR Master Mix 2x (Thermo Scientific)"*, se prepararon tubos de reacción con un volumen final de 20 µL (Tabla 5).

REACTIVO	**µL**
Dream Taq PCR Master Mix 2x (Thermo Scientific)	10
Oligonucleótido Forward	1
Oligonucleótido Reverse	1
Agua	6.5
ADNc	1.5
Volume final	20

Tabla 5. Contenido del tubo de reacción para la reacción en cadena de la polimerasa.

El protocolo de PCR, como el fundamento de la técnica lo marca, constó de tres fases: desnaturalización del ADNc, en esta etapa las muestras se calentaron hasta una temperatura de 94°C durante 30 segundos; alineación, la temperatura descendió durante 30 segundos hasta la temperatura promedio de alineamiento requerida por cada par de oligonucleótidos; extensión, la temperatura alcanzó los 72°C por un minuto para permitir que la enzima Taq polimerasa se uniera a cada iniciador y así, sintetizar una nueva cadena de ADNc. Este ciclo se repitió 30 veces con el objetivo de obtener millones de copias del fragmento de interés. Finalmente los temperatura descendió a 4 °C.

Los oligonucleótidos fueron diseñados mediante el software proporcionado por la empresa *IDT-DNA Technology* (**Tabla 6**); sin embargo, el oligonucleótido para el receptor purinérgico P_2X_7 fue obtenido de la siguiente referencia: **Inhibition of neuronal cell death after retinoic acid-induced down-regulation of P_2X_7 nucleotide receptor expression**,

debido al bandeo múltiple obtenido con el primer oligonucleótido, una vez obtenida la secuencia fue adquirido a través de *Sigma-Aldrich*®.

	DIRECCIÓN	SECUENCIA	LONGITUD	T°m	GC%	pb esperadas
P_2Y_1	Forward	GATTCTGGGCTGTTACGGATTA	22	54.8°	45.5	382
	Reverse	GAGGGTCATGTCTTCACTCTTG	22		50	
P_2Y_2	Forward	GTGCTGGGATTACAGGTATGAG	22	54.95°	50	470
	Reverse	CCAGGAAGTGATGTCAGGTTAG	22		50	
P_2Y_4	Forward	AGAGGTGAGGGAACCCAATA	20	55°	50	307
	Reverse	TCTGGTCTGGGTAGAGAAACA	21		47.6	
P_2Y_6	Forward	TAACCGCACTGTCTGCTATG	20	54.7°	50	450
	Reverse	TTGGCTGTGAGTTTCTGTAGG	21		47.6	
P_2X_1	Forward	GCTCAGTAGATACGTGTGGTTAG	23	54.75°	45.5	266
	Reverse	CGAGGACGGCACTTCTTAAA	20		50	
P_2X_4	Forward	CCCATCAAAGAACAGAGAGGAG	22	54.75°	50	363
	Reverse	CCGCATAAAGTGCTTGAACAG	21		47.6	
P_2X_5	Forward	GGGTGGCGTGATAGGAATTA	20	54.4°	50	253
	Reverse	TACCAGGTCGCAGAAGAAAG	20		50	
P_2X_{7*}	Forward	ACTCCTAGATCCAGGGATAGCC	22	64.15°	50	355
	Reverse	TCACTCTTCGGAAACTCTTTCC	22		50	

Tabla 6. Especificaciones y secuencias de los oligonucleótidos para los receptores purinérgicos utilizados.

3.4. Electroforesis

Terminado el protocolo de RT-PCR, se procedió con la separación electroforética de los productos obtenidos, mediante un gel de agarosa al 1.2 %.

La preparación del gel de agarosa se describe a continuación: 0.6 gr de agarosa disueltos en 50 ml de buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE), la solución se calentó durante 1 minuto y medio, 4 µL de bromuro de etidio (BrEt) fueron añadidos y se gelificó por 40 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se colocaron en el gel empleando 8µL de muestra

diluidos en 15µL de buffer de carga "*6x DNA Loading (Thermo Scientific)*", y como marcador de peso molecular se empleó el patrón de ADN comercial *"GeneRuler 100 bp DNA Ladder"*.

La separación electroforética se realizó en buffer TAE a 65 V durante 90 minutos, finalmente, la adquisición de imágenes se realizó en un documentador de geles *"ChemiDoc (Bio-Rad)"*.

Para la densitometría de los geles se utilizó el software *Image J*.

4. Ensayo de proliferación.

Con el fin de evaluar la supervivencia celular, se dispuso de un método indirecto, como la determinación de proteínas, y un método directo, como el conteo celular.

4.1. Determinación de proteínas

Tras los tratamientos de las células MDA-MB-231, se prosiguió con la determinación de la concentración de proteínas, asumiendo que la concentración de proteínas es directamente proporcional al número de células presentes.

4.1.1. Extracción de proteínas

Los placas fueron lavadas dos veces con PBS 1x no estéril, tras los lavados, las placas se incubaron durante 5 minutos en agitación con 500 µL de tripsina no estéril, se agregaron 700 µL de PBS no estéril; el contenido del pozo fue homogeneizado mecánicamente y se colocó en tubos de 1.5 mL. Para la formación del pellet, los tubos se centrifugaron durante 5 minutos a 5,000 rpm, se retiró el sobrenadante y se agregó 250 µL de buffer de radiounmunoprecipitación (RIPA); el contenido del tubo se homogenizo en un vortex durante 30 segundos, se dejó reposar 5 minutos, y se homogeneizo nuevamente; para terminar y permitir la separación del contenido proteico, las muestras se centrifugaron a 13,200 g durante 30 minutos; el sobrenadante se recuperó en tubos de 1.5 ml y se procedió a su cuantificación.

4.1.2. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se efectuó usando el kit comercial *"Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)"*, kit de detección del ácido bicinconínico (BCA), este método combina la reducción del ion cobre por una proteína en un medio alcalino con la detección del cambio colorimétrico, debido a la quelación de dos moléculas de ácido bicinconiníco con un ión cuproso (Fig. 16).

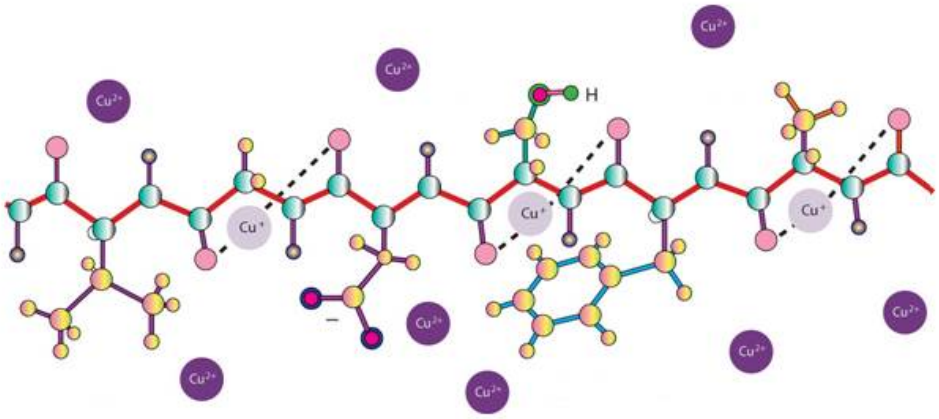


Figura 16. Representación esquemática de la reacción de Biuret. La presencia de proteínas en una mezcla se puede determinar mediante la reacción del Biuret. El reactivo de Biuret contiene CuSO4 en solución acuosa alcalina (NaOH o KOH). La reacción se basa en la formación de un compuesto de color violeta, debido a la formación de un complejo de coordinación entre los iones Cu^{2+} y los pares de electrones no compartidos del nitrógeno que forma parte de los enlaces peptídicos

Una serie de diluciones de una proteína de concentración conocida se realizan (albúmina sérica de bovino, BSA) con la subsecuente obtención de la absorbancia emitida para después poder determinar la concentración de nuestras muestras problema, siguiendo las instrucciones del kit: se preparó una curva de albúmina para un rango de trabajo (concentración de proteínas) de 20-2,000µg/mL con concentraciones de BSA crecientes (0, 25µg, 125µg, 250µg, 500µg, 750µg, 100µg, 1500µg y 2000µg por mililitro); para la cuantificación de las muestras problema, así como para cada uno de los puntos de la curva, se preparó un tubo de reacción, el cual contenía 50 µL de la muestra más 500 µL de la solución de trabajo; los tubos fueron incubados durante 30 minutos a 37°C y finalmente, se

determinó su absorbancia en un fotómetro "*Biophotometer (Eppendorf)*, a una longitud de onda de 562 nm.

La solución de trabajo fue elaborada en una relación 50:1 de los reactivos A y B, respectivamente, proporcionados por el kit.

Tras obtener los valores de absorbancia de la curva de albúmina, así como de las muestras problema; se graficó la concentración contra la absorbancia emitida por las diluciones de albúmina se realizó una regresión linear con el objetivo de obtener un ajuste de relación entre la concentración de proteínas y la absorbancia, una gráfica muestra aparece en la Figura 17, se graficó la concentración de las respectivas diluciones de albúmina vs la absorbancia emitida por las diluciones y el resultado de la regresión lo linear. .

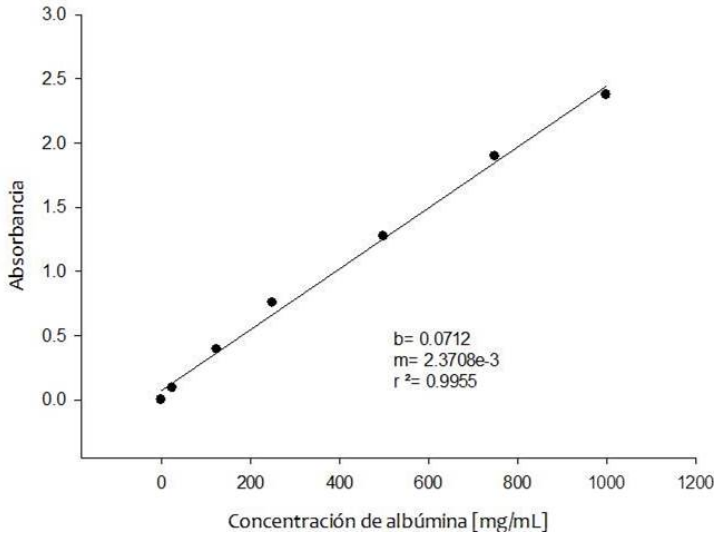


Figura 17. Gráfica concentración de albúmina vs absorbancia. La gráfica fue construida con los valores de absorbancia emitidos por cada dilución de albúmina empleada para poder determinar la concentración de proteínas en un rango de trabajo de 20-2,000µg/mL. Se realizó una regresión linear para determinar la relación entre la concentración de proteínas de una muestra y su valor de absorbancia, podemos ver que la relación entre estas dos variables es lineal.

Finalmente y para obtener la concentración de proteínas de las muestras problema, se sirvió de la ecuación de la recta:

$$y = mx + b$$

Puesto que los valores de ***y*** (absorbancia), tras la regresión lineal, ***m*** (pendiente) y ***b*** (intercepto) se conocen; el obtener el valor de ***x*** (concentración de proteínas) de cada muestra es posible.

$$x = (y - b)/m$$

4.2. Conteo celular

Luego de someter a la línea celular MDA-MB-231 a los diversos tratamientos, se realizó el conteo celular como una medida directa de la supervivencia celular.

El contador de células portátil *"SCEPTER ™ 2.0 Cell Counter (Millipore)"* posee como base de su funcionamiento al Principio de Coulter, el cual permite la cuantificación de partículas en solución con base en su tamaño; a medida de que la partícula fluye por la apertura del sensor irrumpe la corriente, incrementando la resistencia y produciendo un subsecuente incremento del voltaje (Fig. 18).

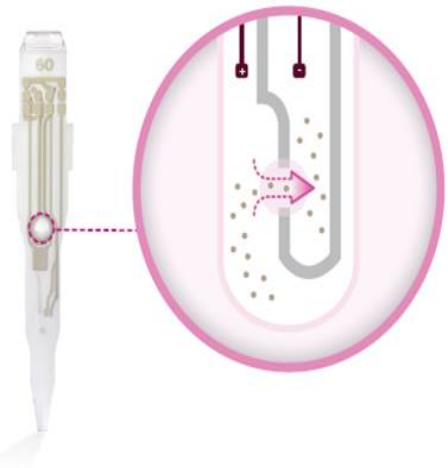


Figura 18. Mecanismo de conteo celular. El conteo de células se lleva acabo empleando una pequeña cantidad de volumen y empleando el Principio de Coulter, el cual se apoya en partículas qu se desplazan a través de un campo eléctrico ocasionando distoriones, las distiorsiones son proporcionales al tamaño de la partícula. (SCEPTER ™ 2.0 Cell Counter)

Así, las placas se lavaron dos veces con PBS 1X no estéril, tras los lavados, se incubaron durante 5 minutos en agitación con 500 µL de tripsina no estéril, al finalizar la incubación se añadió 1 mL de PBS no estéril; el contenido de la placa fue re-suspendido y fue transferido a tubos de 1.5 mL, se homogeneizo el contenido y se efectuó el conteo con el

"SCEPTER ™ 2.0 Cell Counter(Millipore)". La concentración de células se obtiene como el número de células por mililitro.

Adicionalmente a la concentración de células el *SCEPTER ™ 2.0 Cell Counter* nos brinda un histograma de la distribución de las células con respecto a su diámetro; tras el análisis de este histograma se pueden obtener datos referentes a la etapa del ciclo celular y a la viabilidad celular: el tamaño más pequeño lo presentan las células que se hallan en la fase G1/G0, el tamaño de las células tiende a incrementar hasta duplicar su tamaño mientras transita por las fases S y M, las células alcanzan su diámetro máximo cuando se encuentran en la fase G2 del ciclo celular, antes de que la célula se divida. Además, una reducción drástica en el volumen celular es considerada como un marcador de la progresión de la apoptosis (Ongena, 2014).

5. Análisis estadístico

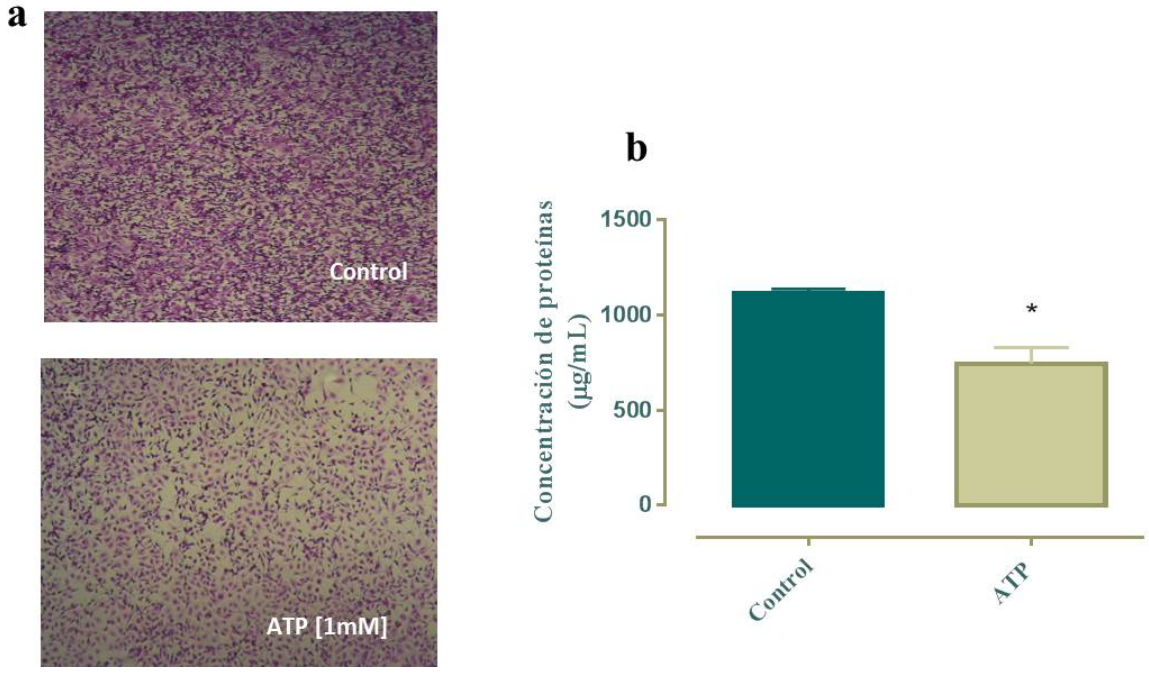
Los experimentos mostrados en este trabajo fueron repetidos al menos tres veces, y los datos obtenidos se presentan, en general, como la media aritmética ± el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico y las gráficas se elaboraron con el software "GraphPad Prism 6 Demo". En el estudio del efecto de ATP extracelular sobre la proliferación celular, así como en la expresión diferencial del receptor P2X7; las comparaciones entre medias requirieron una prueba *t* de *Student* no pareada. En el estudio de la curva dosis-respuesta y la dependencia del efecto al tiempo, las medias se compararon mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, seguido de una prueba de comparación múltiple *Dunnett* y *Tukey*, respectivamente. El análisis de las diferencias entre las concentraciones de 10 y 1000 µM de ATP en cuatro tiempos requirió de un ANOVA de dos vías, seguido de una comparación múltiple *Sidak*. Por último, la expresión diferencial del ARNm del receptor P2X7 se analizó con una prueba *t* de *Student* no pareada. Se consideró una diferencia significativa cuando el valor de la $p < 0.05$ (*).

Resultados

1. La presencia de ATP extracelular disminuye el número de células de línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.

El efecto que ejerce ATP sobre la capacidad proliferativa de diferentes tipos de cáncer ha sido ampliamente descrito; Shabbir y colaboradores (2008), observaron que la presencia de ATP reducía la proliferación celular en células insensibles a andrógenos provenientes de cáncer de próstata. Este antecedente nos indujo, inicialmente, a investigar si ocurre un fenómeno parecido en células insensibles a estrógenos de cáncer de mama, células MDA-MB 231.

La incubación de las células con 1 mM de ATP reduce el número de células MDA-MB-231 por campo que se observa en las micrografías de la Figura 19a al compararlas con células que fueron cultivadas sin adición de ATP (condición control); resultados similares fueron obtenidos al realizar la cuantificación de proteínas y el conteo celular. La concentración de proteínas en las células tratadas con ATP durante 72 horas fue de 745.5 ± 83.52 µg/mL a comparación de las células control cuya cuantificación arrojo un valor de 1113 ± 23.41 µg/mL, una baja de del 33% con respecto a la condición control es observada (Figura 18b); por su parte la cuenta celular disminuyo de $6.99x10^5$ en la placa control a $5.48x10^5$ en aquella placa que fue tratada con 1 mM de ATP, también podemos observar un desplazamiento del histograma de las células tratadas con ATP (Figura 18c).



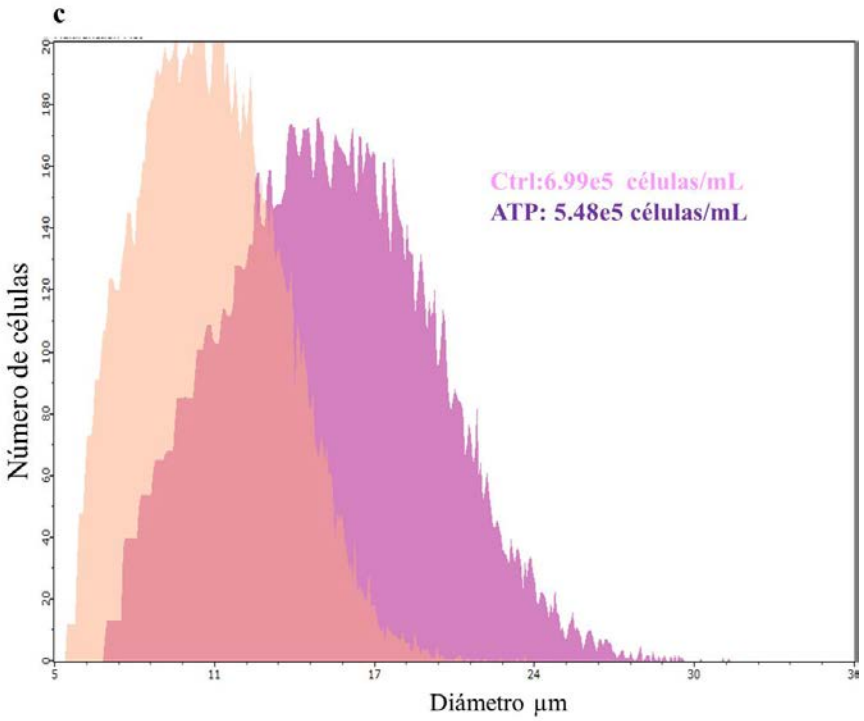


Figura 19. Efecto de 1mM de ATP sobre células MDA-MB-231. **(a)** Microfotografías que muestra la disminución de la presencia de células teñidas con cristal violeta tras haber sido expuestas a 1mM de ATP durante 72 horas de tratamiento. **(b)** La presencia de ATP disminuye la concentración de proteínas con respecto a la condición control. Las barras representan la media ± SEM de los niveles de proteínas obtenidos en µg/mL, se aprecia una reducción del 33 % con respecto a la condición control. **(c)** Histogramas de frecuencia que muestran la reducción en el número de células después de haber sido tratadas con ATP por 72 horas, así como el desplazamiento del histograma de las células tratadas hacía la derecha. n=3 * $p<0.05$

2. El tratamiento con ATP inhibe la capacidad proliferación de la línea celular MDA-MB-231 de una manera dependiente de la concentración.

La concentración inicial que empleamos de ATP fue de 1 mM, que a las 72 horas redujo en más de un 30% la proliferación celular; por lo que decidimos averiguar si, el efecto del ATP sobre la proliferación celular depende de la concentración empleada. La Figura 20 muestra una serie de microfotografías de células MDA-MB 231 mantenidas en cultivo en presencia de diferentes concentraciones de ATP (100 µM, 500 µM, 1000 µM, 2000 µM y 5000 µM) con un tiempo constante de tratamiento de 72 horas, claramente se parecía que el efecto inhibitorio sobre la proliferación celular aumenta de manera proporcional al incremento de la concentración de ATP utilizada, podemos distinguir que para la concentración más alta utilizada (5 mM), la placa se presenta casi vacía.

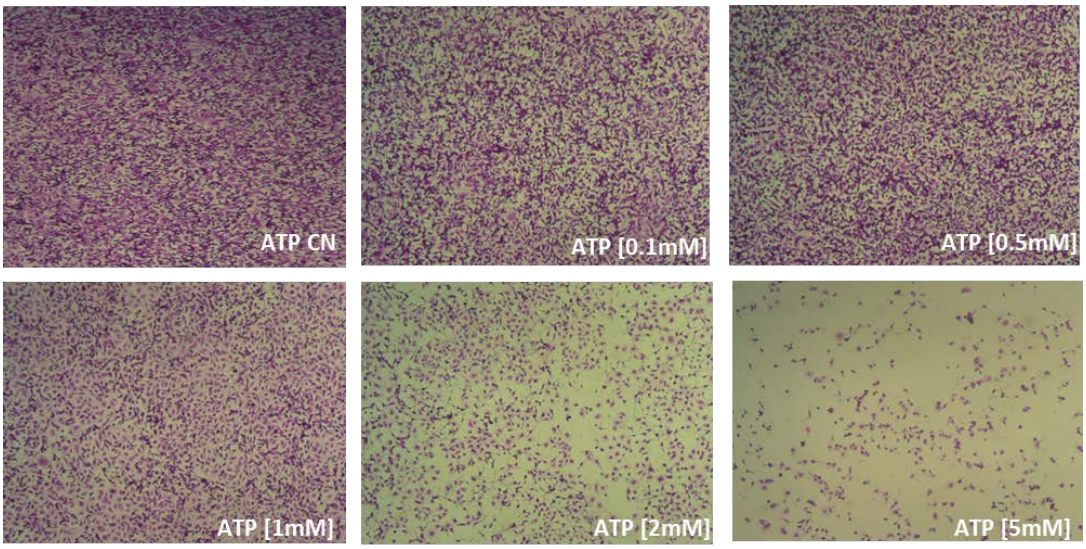


Figura 20. ATP modifica la proliferación de la línea celular MDA-MB-231 en forma dosis-dependiente. Panel de micrografías que muestra una sucesiva disminución del número células por campo teñidas con cristal violeta de manera correspondiente al aumento de concentración de ATP empleada [100 µM, 500 µM, 1000 µM, 2000 µM y 5000 µM].

Se realizó la cuantificación de proteínas, hallando un correlato positivo con respecto a lo observado en las microfotografías, ya que la concentración de proteínas va disminuyendo conforme el incremento de ATP empleado de ATP. Los datos se presentan como el porcentaje de proteínas con respecto a la condición control y al compararlos observamos diferencias significativas con en las células tratadas con 1000 µM y 2000 µM de ATP (Figura 21); la aplicación de ATP fue hecha cada 24 horas hasta finalizar el tratamiento.

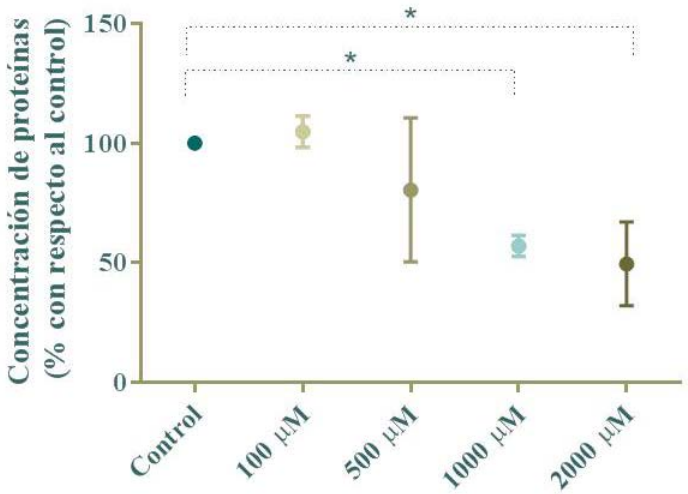


Figura 21. ATP modifica la proliferación de la línea celular MDA-MB-231 en forma dosis-dependiente. Gráfico que muestra la disminución en la concentración de proteínas manera correspondiente al aumento de concentración de ATP empleada [100 µM, 500 µM, 1000 µM y 2000 µM], al comparar los grupos con el control se observan diferencias significativas solo con las concentraciones 1000 µM y 2000 µM; una comparación entre grupos revela diferencias significativas entre 100 µM vs 1000 µM y 100 µM vs 2000 µM. n=3 * $p<0.05$

Y de manera paralela, se realizó una curva dosis-efecto con la intención de corroborar la relación lineal entre la disminución de la concentración de proteínas y el aumento de la concentración empleada de ATP, la gráfica mostrada en la Figura 22 se obtuvo empleando el logaritmo de la concentración de ATP (log 10 µM = 1; log 100 µM = 2; log 500 µM = 2.69; log 1000 µM = 3; log 2000 µM = 3.3,) y el efecto sobre la concentración de proteínas, la forma de la curva creada por el ajuste apoya la relación lineal observada. El análisis arrojo un valor de Log EC50 de 3.052 lo que equivaldría a un valor de EC50 de 1126 µM.

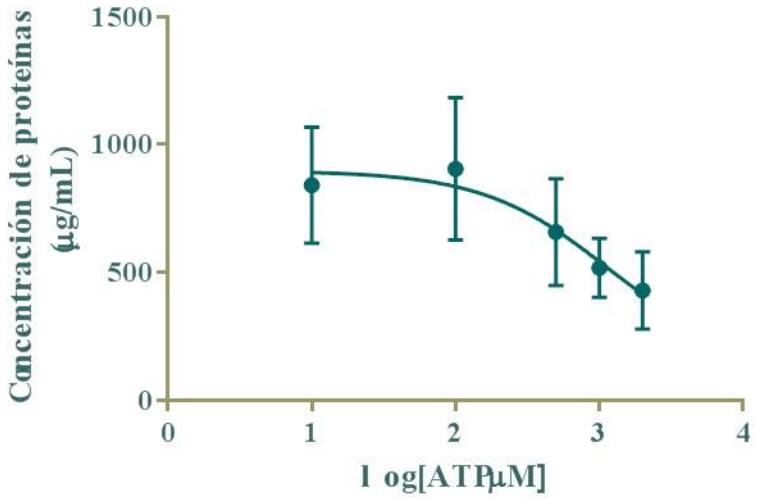


Figura 22. Curva dosis-efecto a ATP. Efecto de la aplicación de ATP extracelular sobre cultivos de la línea celular MDA-MB-231 durante 72 horas, se observa que un incremento en la concentración de la dosis empleada de ATP la concentración de proteínas (µg/mL) disminuye, el valor de EC50 obtenido fue de 1129 µM de ATP. n=3

3. El efecto inhibitorio de ATP sobre la capacidad proliferativa de las células MDA-MB-231 depende de la duración del tratamiento.

La curva dosis-efecto mostrada anteriormente, pone en evidencia que a partir de una concentración de 1 mM de ATP por 72 horas se reduce de manera significativa la capacidad proliferativa de las células MDA-MB 231; con base en ello, indagamos si el efecto observado a dicha concentración depende de la duración del tratamiento, por lo cual procedimos a realizar un curso temporal del efecto del ATP a diferentes tiempos de tratamiento (24, 48, 72 y 96 horas) y a una concentración constante de 1 mM de ATP.

La Figura 23 muestra, los resultados obtenidos de la determinación de proteínas y del conteo celular; es necesario el transcurso de, por lo menos, 72 horas de tratamiento para observar un efecto inhibitorio significativo sobre la cuantificación de proteínas con una reducción de cercana al 50% de la concentración de proteínas con respecto a la condición control para las 72 horas mientras que la reducción es >50% para las 96 horas (Fig. 23a). En cuanto al conteo celular control se refiere, los gráfica que aparece en la Figura 23b ratifica lo obtenido por la cuantificación de proteínas, un lapso de 72 horas es necesario para observar un efecto inhibición de la proliferación celular, las reducciones del conteo celular a las 72 y 96 horas son similares a las mostradas en la Figura 23a.

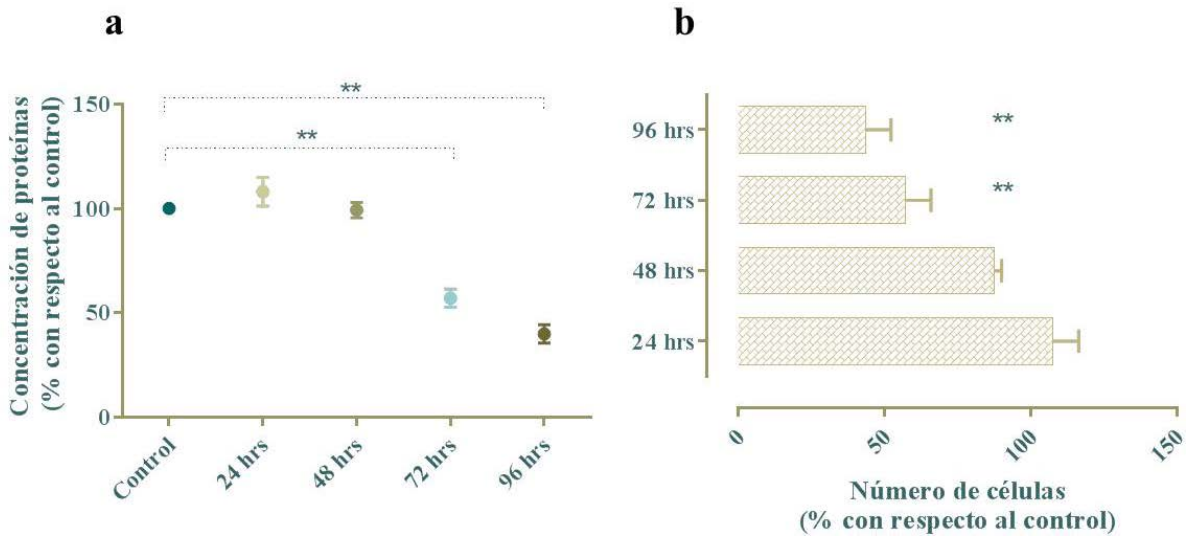


Figura 23. ATP modifica la proliferación de la línea celular MDA-MB-231 en forma dependiente del tiempo de tratamiento. **(a)** Curso temporal de una determinación de cuantificación de proteínas de placas de cultivo de la línea celular MDA-MB-231, luego de haber sido expuestas a una concentración de 1000µM de ATP durante diferentes tiempos (24, 48, 72 o 96 hrs); la disminución en el porcentaje de concentración de proteínas a las 72 hrs es cercana al 50% y <50% para las 96 horas de tratamiento; al realizar una comparación entre grupos de tiempo se observan diferencias significativas entre 24 hrs vs 72 hrs y entre 24 hrs vs 96 hrs. Los datos se presentan como el % con respecto al control. **(b)** Curso temporal de cuantificación celular bajo las mismas condiciones de la cuantificación de proteínas; las disminuciones observadas a las 72 y 96 hrs apoyan los resultados previamente descritos. n=3 * $p<0.05$

En la Figura 24 aparecen histogramas y valores representativos obtenidos al evaluar el número de células a los cuatro diferentes tiempos involucrados en el curso temporal (24, 48, 72 y 96 hrs), se nota un disminución importante tanto en el valor del conteo como en la

distribución del histograma a las 48 horas con respecto a las 24 horas, sin embargo al realizar el análisis estadístico esta diferencia no fue significativa, además se aprecia una tendencia de desplazamiento del histograma hacia la derecha misma que también se observa aunque de manera más pronunciada a las 72 y 98 horas de tratamiento con 1 mM de ATP.

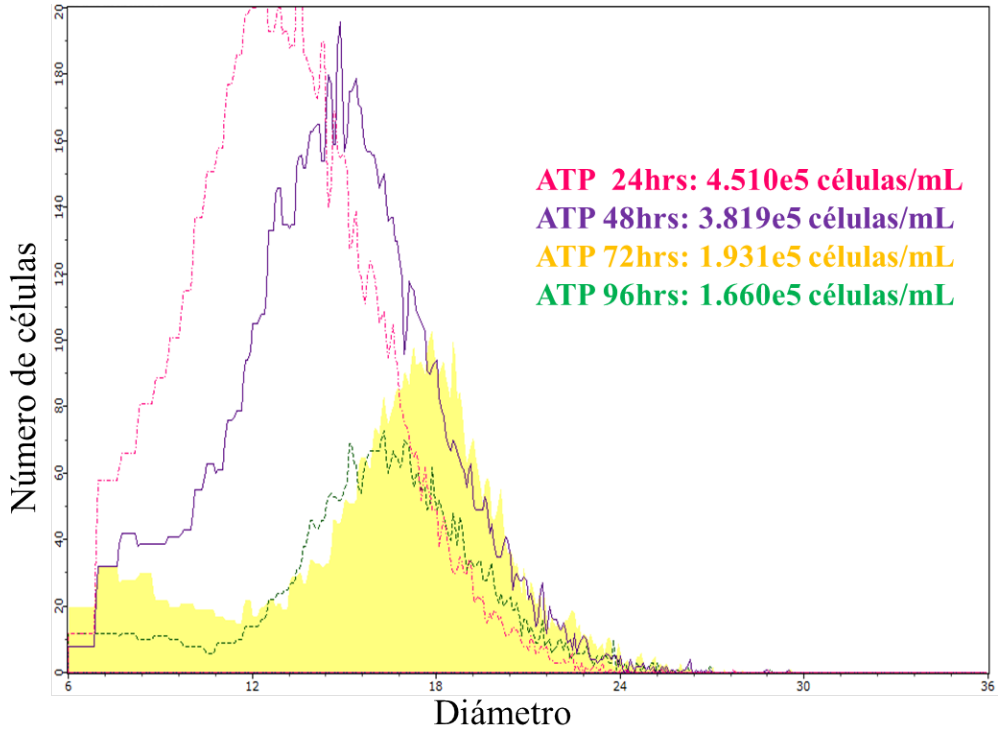


Figura 24. ATP disminuye el número de células en una manera dependiente de la concentración empleada. Histogramas representativos obtenidos al realizar el curso temporal de la figura 22b, tres características son remarcables: primera, conforme aumenta el tiempo de exposición a ATP, el espacio ocupado por el histograma disminuye, así como la cuenta celular por mililitro; segundo, el aumento de exposición provoca un desplazamiento de los histogramas hacia la derecha, y tercera, a las 72 horas el histograma presenta un primer pico localizado en los diámetros celulares más pequeños.

4. La línea celular MDA-MB-231 expresa el ARNm de diversos integrantes de la familia de receptores purinérgicos P_2.

La respuesta observada en las células MDA-MB 231 en presencia de ATP sugiere la posibilidad de que estas células expresen un receptor purinérgico de clase P_2 que, a diferencia de los P_1, son sensibles a ATP; por lo que evaluamos la expresión de receptores purinérgicos.

Ensayos de RT-PCR muestran que las células MDA-MB 231 expresan el ARNm que codifica para los receptores: P_2Y_1, P_2Y_4, P_2Y_6, P_2X_1, P_2X_4, P_2X_5 y P_2X_7 (Figura 25a). Al realizar la electroforesis para el oligonucleótido para el receptor P2X7 presentó multibandeo; por separado se realizó una RT-PCR para este receptor con un nuevo oligonucleótido obtenido de la empresa *Sigma-Aldrich*® (Figura 25b). Se realizó el análisis densitométrico de las bandas observadas en el gel de agarosa cuyo resultado se muestra en la Figura 25c, los diversos ARNm de receptores purinergicos presentan prácticamente el mismo nivel de expresión.

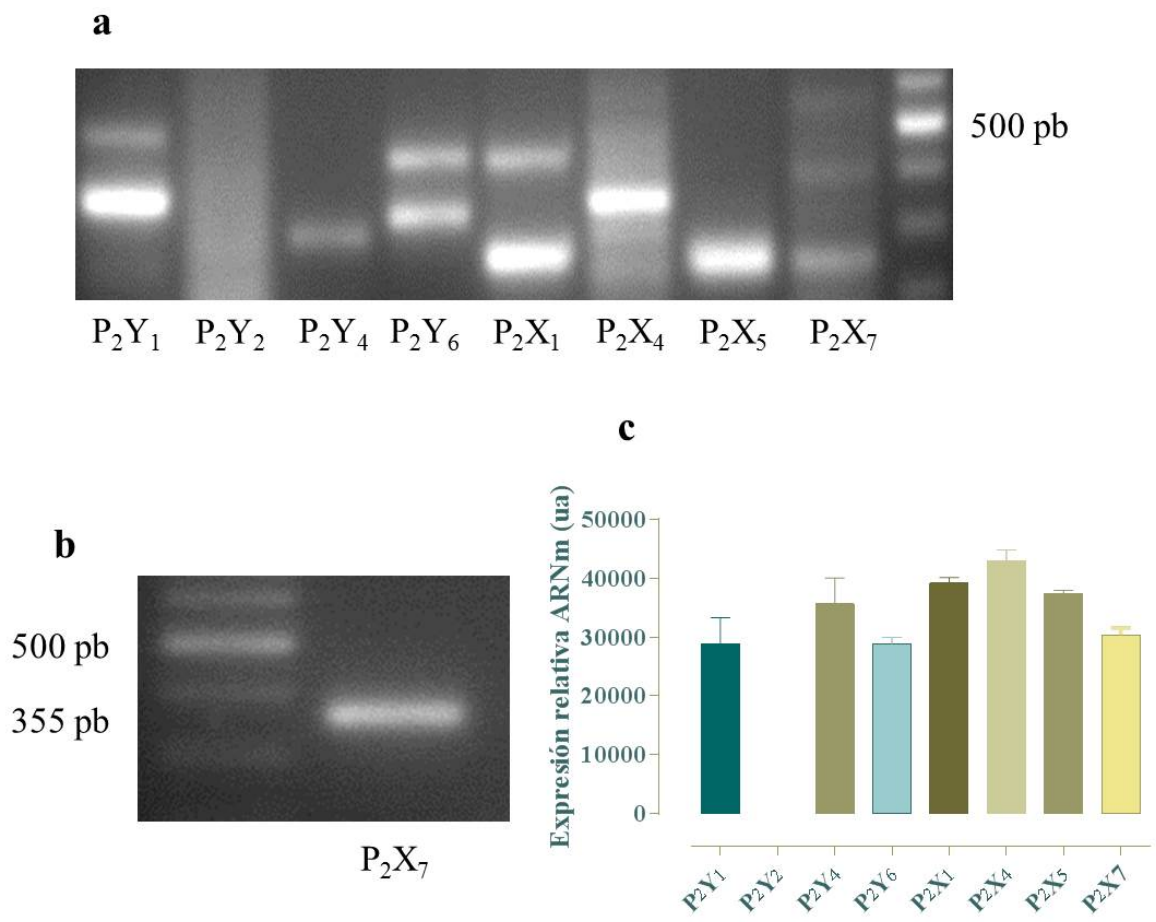


Figura 25. Expresión del ARN mensajero que codifica para distintos integrantes de la familia de receptores purinérgicos P2. **(a)** Fotografía representativa de un gel de agarosa que muestra la presencia de bandas que corresponden a los pesos esperados para cada receptor purinérgico probado, no se halló banda para el receptor P_2Y_2. **(b)** Expresión relativa del receptor P2X7, empleando un segundo juego de oligonucleótidos. **(c)** A continuación los geles fueron analizados mediante una densitometría, así la gráfica representa la media ± SEM de los niveles de ARNm obtenidos en unidades de expresión arbitrarias. n=3

5. La activación del receptor purinérgico P_2X_7 es el responsable del efecto inhibitorio que ejerce el ATP sobre la capacidad proliferativa de las células MDA-MB 231.

Dado que los resultados de los ensayos de RT-PCR presentados muestran que la línea celular MDA-MB 231 expresa el ARNm que codifica para 7 receptores purinérgicos, el efecto inhibitorio sobre la proliferación celular de ATP podría ser desencadenado por cualquiera de estos receptores. La curva dosis-efecto nos indica que es necesario una concentración mínima de 1 mM de ATP para que se presente una reducción significativa en la proliferación celular, con esta información y las características de afinidad que se han descrito previamente para los receptores P2, propusimos que el responsable del efecto de ATP aquí observado era la activación del receptor purinérgico P_2X_7.

Con el fin de validar proposición realizamos un ensayo de proliferación celular evaluando una baja y un alta concentración de ATP (10µM y 1000 µM) a diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96 horas). En la Figura 26 (a y b) aparecen los resultados de este ensayo: una baja concentración de ATP es incapaz de ejercer un efecto inhibitorio sobre la concentración de proteínas a cualquiera de los tiempos probados mientras que una alta concentración de ATP (1000 µM) induce una reducción significativa de la concentración de proteínas a partir de 72 horas de tratamiento, tal y como habíamos reportado previamente. Los resultados de la cuantificación celular son equiparables a los obtenidos por la determinación de proteínas. Para el histograma obtenido las diferencias son remarcables entre ambas concentraciones (10µM y 1000µM), por una parte la reducción del histograma de frecuencias para a concentración alta es notorio mientas que con 10µM aparece con casi rodeando al de la condición control; asimismo, el desplazamiento observado en Figuras anteriores con la concentración de 1000µM parece nuevamente. Estos resultados apoyan la propuesta de que la activación del receptor purinérgico P2X7 regula el efecto inhibitorio del ATP sobre la capacidad proliferativa en las células MDA-MB 231.

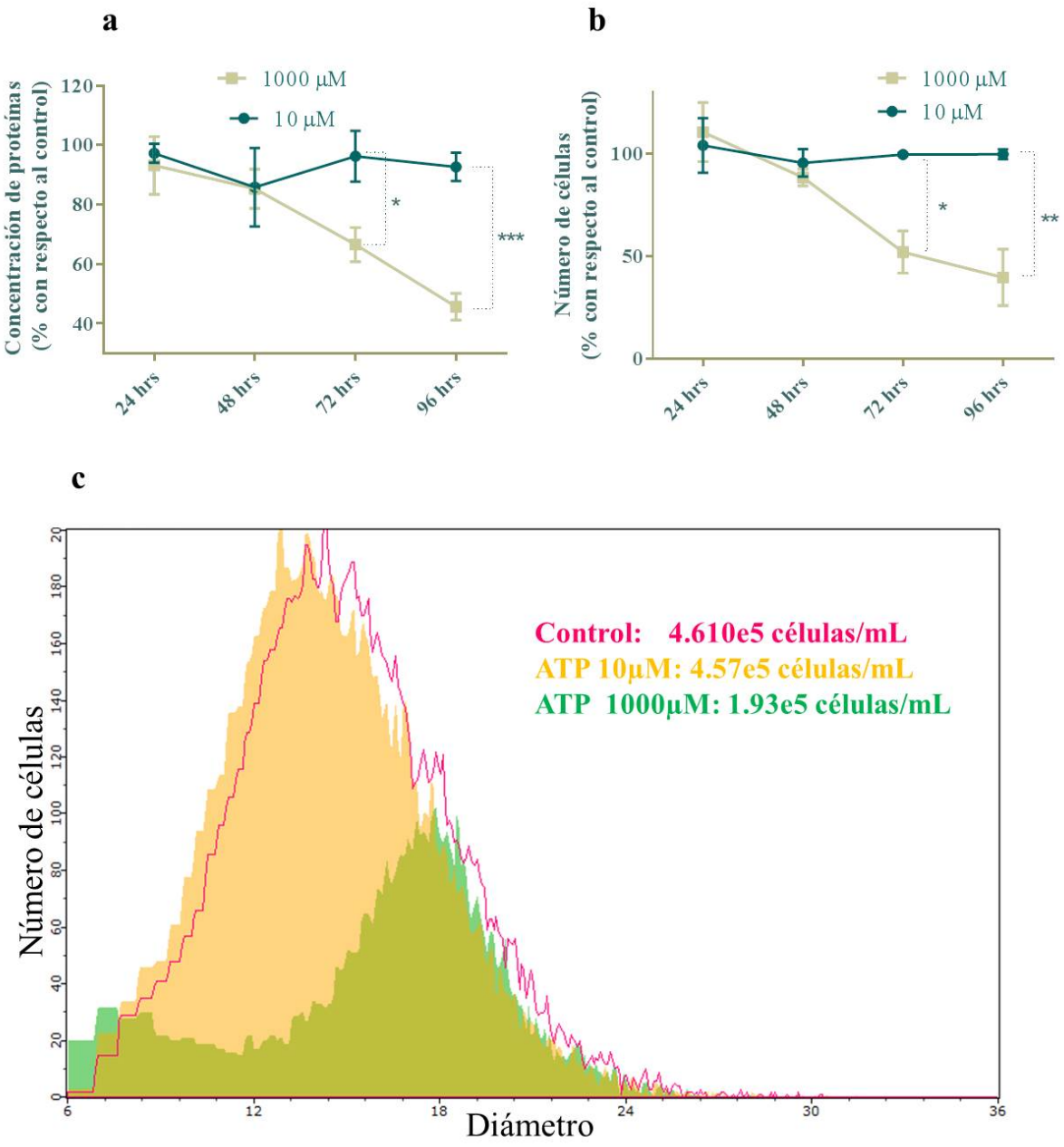


Figura 26. La activación del receptor purinérgico P2X7 inhibe la proliferación de la línea celular MDA-MB-231. **(a)**, cuantificación de proteínas y **(b)** conteo de células MDA-MB-231 tratadas con dos concentraciones de ATP, una baja (10 µM) y una alta (1000 µM) durante 4 tiempos diferentes que muestra que el efecto inhibitorio solo se presenta al tratar a las células con 1000 µM de ATP, misma que es suficiente para activar al receptor P_2X_7, a partir de las 48 horas de tratamiento observamos una tendencia, sin embargo no es sino hasta las 72 horas cuando vemos una disminución de la concentración de proteínas y células de manera significativa. **(c)**, histograma representativo de la cuantificación celular se aprecia que para una baja concentración de ATP en escala micromolar, el conteo celular no se ve alterado así como la distribución del número de células con respecto a su tamaño. n=3 * $p<0.05$

Para continuar con la validación de nuestra propuesta, procedimos a emplear un agonista específico para el receptor P2X7, el Bz-ATP, análogo no hidrolizable de ATP. Mantuvimos las células MDA-MB 231 en presencia de 250 µM de Bz-ATP por 24, 48, 72 y 96 horas; finalizado el tratamiento, determinamos el número de células (Figura 27a) y la concentración de proteínas (Figura 27b). El Bz-ATP a una concentración de 250 µM es capaz de mimetizar el efecto, inhibitorio de la proliferación celular, que ejerce ATP a partir de las 48 horas de tratamiento sobre el número de células y la concentración de proteínas. Los histogramas representativos del conteo celular empleando ATP y Bz-ATP se sobreponen (27c).

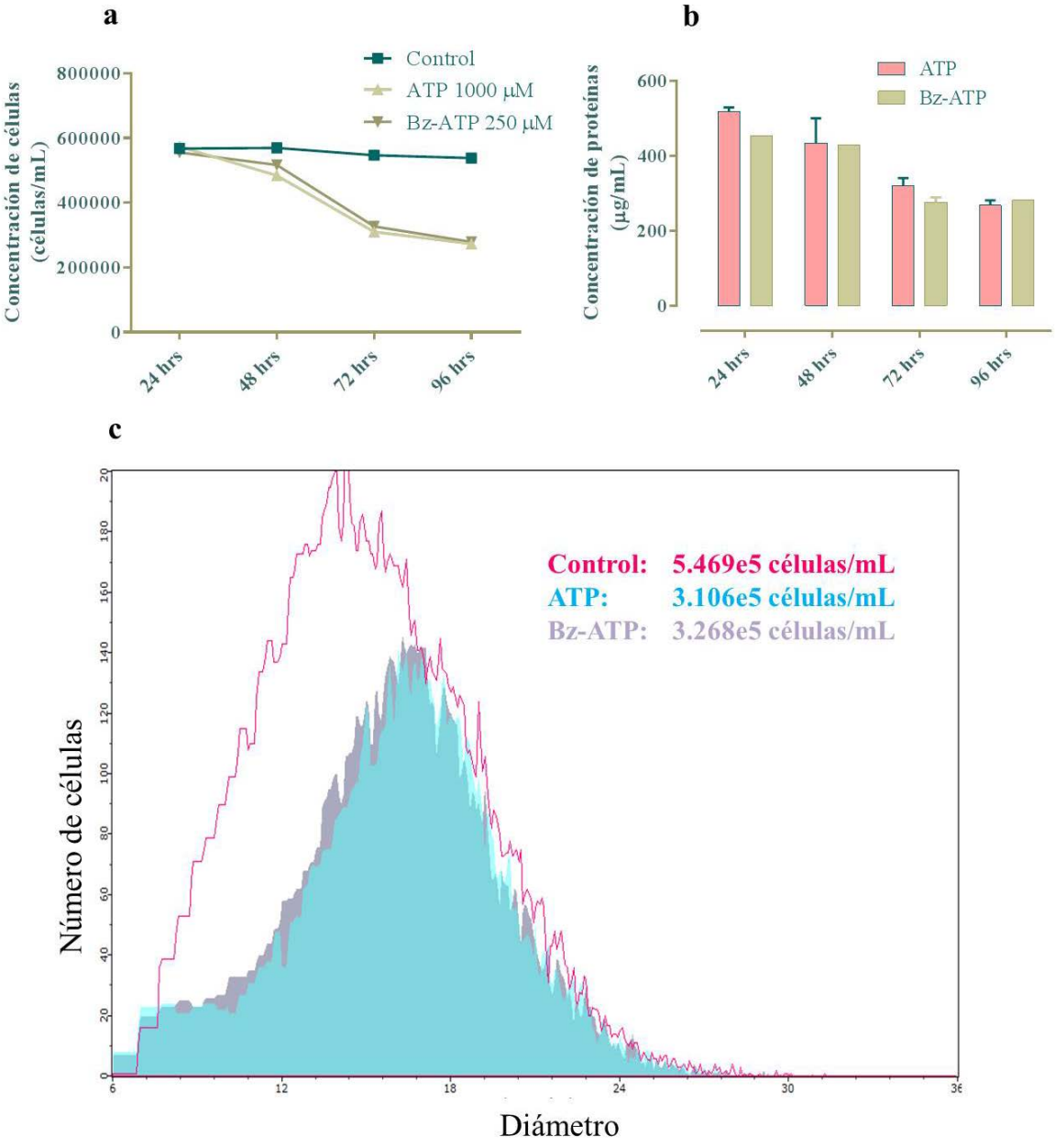


Figura 27. Bz-ATP tiende a mimetizar el efecto inhibitorio del ATP en la línea celular MDA-MB-231. **(a)** Cuantificación celular realizada tras haber tratado a las células con ATP (1000 µM) o Bz-ATP (250 µM) durante cuatro diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96 hrs), observamos que el agonista específico para el receptor P2X7 mimetiza el efecto producido por ATP sobre la proliferación celular. **(b)** Determinación de proteínas bajo las mismas condiciones arriba mencionadas, la gráfica presenta un patrón de disminución similar a la cuantificación celular. **(c)** Histograma representativo de la cuantificación celular. n=3 *p<0.05

6. El nivel de expresión del receptor P2X7 es inversamente proporcional al grado de malignidad de las células de mama.

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que la activación del receptor purinérgico P2X7 por ATP o Bz-ATP induce inhibición de la proliferación celular en las células MDA-MB 231; por las características de alta invasividad de la línea celular nos resulta paradójica la presencia de este receptor en dicha línea; Li y cols. (2006) mostraron que el receptor P2X7 se encuentra presente en células cáncerígenas de mama, ectocervix y vejiga, sin embargo su presencia es cerca de dos veces menor con respecto a células epiteliales normales derivadas de los mismos tejidos; así se propone que el nivel de expresión de este receptor es inversamente proporcional a la capacidad invasiva de las células

Por esta razón, decidimos comparar la expresión del ARNm del receptor P2X7 de las células MDA-MB-231 contra dos líneas celulares más: MCF-10A, células epiteliales normales de mama; y MCF-7, células tumorales de mama con baja capacidad invasiva.

Tras cultivar cada línea celular por separado, esperar que alcanzaran una confluencia del 80%, se sometieron a un protocolo de expresión génica con las mismas especificaciones previamente descritas; los oligonucleótidos antes mencionados para el receptor P_2X_7 fueron empleados en las tres muestras de ARN obtenido. En la Figura 28 observamos que la expresión del ARNm del recepto purinérgico P_2X_7 muestra diferencias; luego de ponderar los resultados de tres muestras independientes por línea celular (Figura 28b) observamos que las líneas celulares MCF-7 y MCF-10A expresan una cantidad mayor del ARNm para el receptor P_2X_7 que las células MDA-MB-23, la diferencia entre MDA-MB-231 y MCF-7 fue significativa.

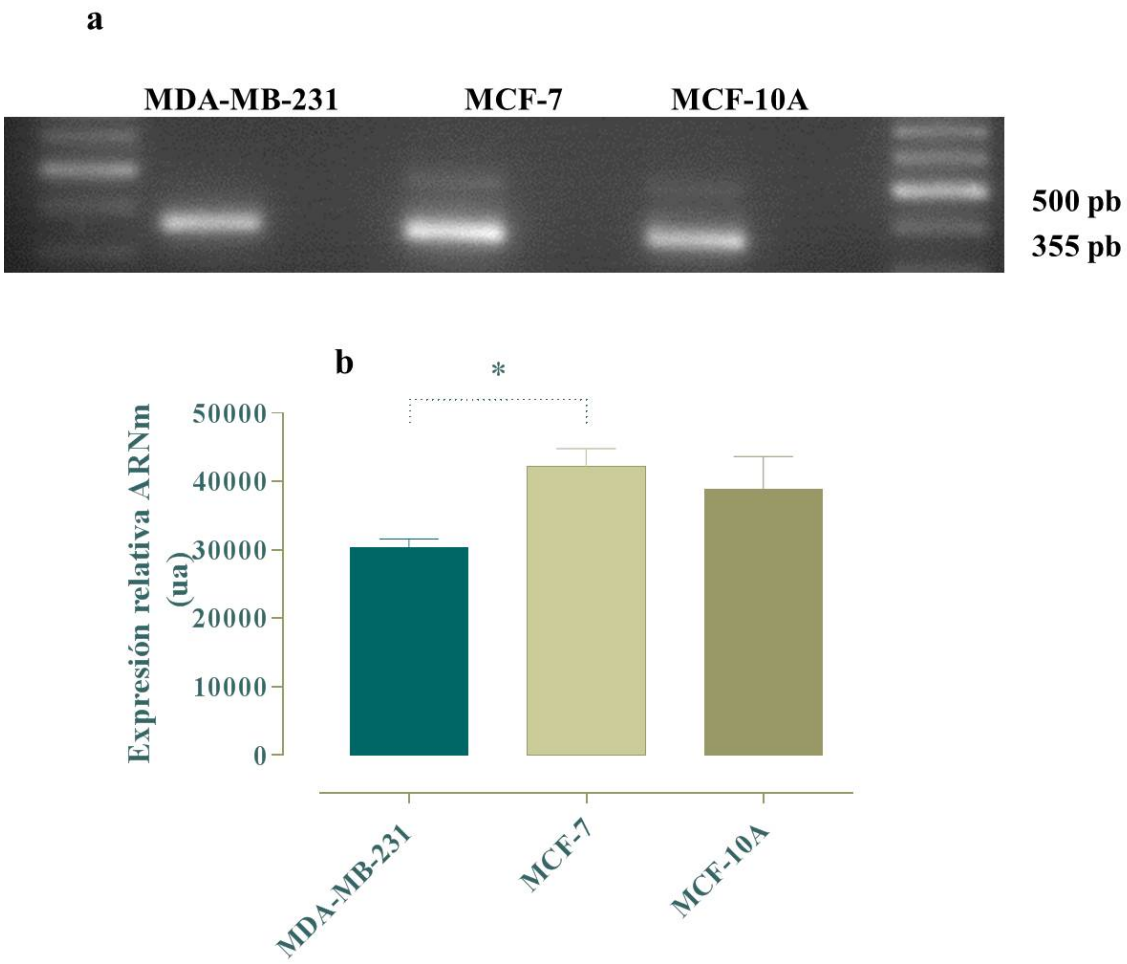


Figura 28. Expresión del ARN mensajero que codifica para el receptor purinérgico P_2X_7 en tres líneas celulares. **(a)** Fotografía representativa de un gel de agarosa que muestra la expresión distintiva en tres líneas celulares. **(b)** El análisis densitométrico revela que existe una diferencia significativa entre la expresión del receptor mostrada por la línea celular MDAMB-231 con respecto a la línea MCF-7. n=3 * $p<0.05$

Discusión

A partir de la descripción de los componentes de adenina como moléculas de señalización extracelular, el número de estudios realizados con el objetivo de conocer el rol que desempeña la señalización purinérgica en la fisiopatología de distintas enfermedades ha ido en aumento, en particular, existe un interés especial en el potencial terapéutico de la señalización purinérgica en el tratamiento contra el cáncer.

Con este enfoque, diversas publicaciones han descrito los efectos que ejerce ATP sobre la sobre la capacidad proliferativa de células tumorales en estudios *in vitro* e *in vivo*, el efecto observado parece ser bifásico: altas concentraciones de ATP o sus análogos produce un efecto citotóxico mientras que bajas dosis de ATP promueven el crecimiento tumoral(Adinolfi *et al.*, 2012; Deli *et al.*, 2008; Di Virgilio *et al.*, 2009; Shabbir et al., 2008, Rapaport *et al.*, 1989). Los efectos de ATP depende de la concentración empleada y del subtipo de receptor P_2 activado; estas observaciones, recalcan la necesidad de una profunda caracterización de los receptores P_2 involucrados en el efecto citotóxico de ATP presentes en las células tumorales, específicamente en un modelo de cáncer de mama altamente invasivo, como la línea celular MDA-MB 231, con el fin de reconocer plenamente el potencial de la señalización purinérgica en la terapia contra el cáncer.

En el presente trabajo de investigación se describe el efecto inhibitorio que ejerce el ATP sobre la proliferación celular en la línea celular de cáncer de mama resistente a estrógenos, MDA-MB-231. Los resultados presentados muestran, inicialmente, que la presencia crónica de una alta concentración de ATP (1 mM) reduce la capacidad proliferativa de las células MDA-MB 231, tanto a nivel de cuenta celular como de la concentración de proteínas, considerando la concentración de proteínas como un indicador indirecto de la concentración celular. Este resultado coincide con el efecto antineoplásico de ATP reportado por Rapaport en cáncer de páncreas (Rapaport & Fontaine, 1989).

El efecto inhibitorio del ATP sobre la capacidad proliferativa en las células MDA-MB 231 depende tanto de la concentración de ATP, tras la evaluación del número de células por campo y la cuantificación proteica de células MDA-MB-213 tratadas con diferentes concentraciones de ATP se observa una tendencia de disminución de estos valores de manera proporcional al aumento de la concentración empleada de ATP, es necesaria una concentración superior a 500 μM para observar un efecto significativo en la reducción de la

proliferación celular; esto se confirmó al realizar una curva dosis-efecto en la que se observa una disminución en la concentración de proteínas de manera dependiente al aumento de la concentración de ATP empleada. El análisis arrojo un valor de Log EC50 de 3.052 lo que equivaldría a un valor de EC50 de 1126 µM.

Además, el efecto inhibitorio del ATP sobre la capacidad proliferativa en las células MDA-MB 231 también fue dependiente de la duración del tratamiento, una duración de por lo menos 48 horas de tratamiento fue necesaria para observar una tendencia de disminución de la concentración de proteínas.

Por una lado, la alta concentración de ATP requerida nos sugiere la presencia de un receptor para ATP de baja afinidad, tal sería el caso del receptor P_2X4 y P_2X_7; por otro lado, la duración tan prolongada del tratamiento propone a) la participación de un receptor purinérgico P_2 incapaz de desensibilizarse, de nueva cuenta tal y como el receptor P_2X_4 y P_2X_7; b) acciones a corto plazo como la activación de la vía de las caspasas que desencadenaría muerte celular programada; y c) acciones a largo plazo como la activación de un mecanismo genómico que involucra cambios en los niveles de transcripción en genes específicos, muy probablemente mediado por el ion calcio como segundo mensajero; el ion calcio entraría, siguiendo su gradiente electroquímico, como consecuencia de la activación de los receptores purinérgicos P_2, tanto P_2X como P_2Y (North, 2002).

La respuesta de las células MDA-MB-231 al ATP nos sugiere la presencia de receptores purinérgicos P_2 en su membrana plasmática, característica común en distintas líneas celulares tumorigénicas (tabla 2), cultivos primarios y biopsias de tumores. Este indicio fue confirmado tras los ensayos de expresión génica, en los cuales la presencia del ARNm que codifican para siete subtipos de receptores P_2 fue encontrada: P_2Y_1, P_2Y_4, P_2Y_6, P_2X_1, P_2X_4, P_2X_5 y P_2X_7. El hecho de que la banda esperada para el receptor P_2Y_2 no se hallará presente no quiere decir que este receptor no se exprese en esta línea celular.

Sin embargo, debemos recordar que el ATP en el espacio extracelular es una molécula sensible a la degradación por medio de ectonucleotidasas lo que llevaría a la generación de metabolitos activos, tales como ADP, AMP y adenosina, los cuales podrían resultar responsables del efecto inhibitorio de la proliferación celular que observamos (Geoffrey

Burnstock, 2009). Estudios previos realizados en nuestro laboratorio mostraron que las células MDA-MB 231 expresan un receptor purinérgico P_1, específicamente el receptor A_2B, el cual al ser activado por adenosina causa un aumento en la proliferación celular. Estas evidencias, por una parte, descartan la posibilidad de que metabolitos activos de ATP produzcan una respuesta de inhibición de la proliferación en nuestra línea celular, y apoyan la propuesta de que solamente la activación de receptores P_2 inciden negativamente sobre la proliferación celular de las MDA-MB-231 (Fernández, 2013). Además, se ha descrito que el crecimiento tumoral fue inhibido en ratones deficientes de la proteína CD39 (encargada de la formación de adenosina a partir de ADP), lo que destaca la participación de las ectonucleotidasas en la progresión del cáncer así como de los derivados de ATP.

Un agente antineoplásico puede ejercer su efecto de cuatro diferentes formas: a) inhibición de la proliferación celular; b) promoción de la diferenciación celular (resultando en una inhibición de la proliferación); c) inducción de muerte celular; y d) una combinación de éstas formas. Con respecto al efecto del ATP, sabemos que el resultado final es una combinación de múltiples efectos, debido a la estimulación de más de un subtipo de receptor P_2. Hasta ahora, cinco subtipos de receptor P_2 han sido primordialmente implicados en la inhibición del crecimiento de células tumorales (Figura 13), ellos son: P_2X_5, P_2X_7, P_2Y_1, P_2Y_2 y P_2Y_{11}. Ensayos de RT-PCR muestran que nuestro modelo experimental expresa el ARNm que codifica para diferentes receptores P_2, que durante la aplicación de ATP podrían activarse, por lo que la discriminación del receptor purinérgico involucrado en la disminución de la concentración celular observado en las células MDA-MB 231, es necesaria. El requerimiento mínimo necesario para evocar el efecto de inhibitorio del ATP sobre la proliferación celular (1 mM de ATP durante 72 horas de tratamiento con una EC50 de 1126 µM) y las características farmacológicas de cada uno de los siete receptores P_2 presentes en las células MDA-MB-231, permiten una eliminación rápida de los siguientes receptores: P_2Y_1, P_2Y_4, P_2Y_6, P_2X_1, P_2X_4, P_2X_5, ya que son altamente sensibles a ATP, se activan en el rango nanomolar y micromolar, además de que se desensibilizan, por lo cual no están activos en periodos prolongados. El único receptor expresado que cubriría dichas características es el receptor purinérgico P_2X_7.

Cuatro características distinguen las corrientes evocadas por la activación del receptor P_2X_7 de los otros receptores P_2X: el requerimiento de concentraciones altas de ATP (para expresión en sistema heterólogo se necesitan 100 µM), el hallazgo de que 2’´3’-(benzoil-4-benzoil-)ATP (Bz-ATP) es 5-10 veces más potente que ATP sobre el receptor, el hecho de que el efecto de ATP (y Bz-ATP) puede ser potenciado por la reducción de calcio o magnesio extracelular y la observación de que las corrientes pueden exhibir grandes cambios en el curso del tiempo así como la amplitud con repetidas aplicaciones del mismo agonista (North, 2002).

Al evaluar el efecto de dos concentraciones de ATP sobre la proliferación celular, la primera de ellas de 10 µM, la cual sería capaz de activar a varios de los receptores purinérgicos sensibles, y 1 mM, la cual activaría solo al receptor P_2X_7; hallamos que independientemente del tiempo transcurrido (24 a 96 horas), 10 µM no puede reducir la concentración de proteínas o el número de células mientras que 1 mM de ATP reduce significativamente la proliferación celular.

Aunque Bz-ATP, se reconoce como potente agonista específico del receptor, no está libre de sufrir degradación, de este modo, se ha reportado que el uso de 10 µM Bz-ATP produce un aumento leve en la proliferación celular; con el afán de recabar información que apoyará lo arriba expuesto, se obtuvieron resultados empleando 250 µM Bz-ATP, los cuales muestran una mimetización del efecto de ATP casi perfecta, tanto en la determinación de proteínas como en la cuantificación celular.

El receptor P_2X_7 es el, más ampliamente aceptado como, receptor purinérgico mediador de muerte celular por apoptosis o necrosis, como inicialmente se sugirió por experimentos en líneas tumorales de ratón donde ATP mostró desencadenar muerte celular vía necrosis o apoptosis, dependiendo del tipo celular y de la isoforma del receptor P_2X_7 expresada. El análisis del efecto del receptor P_2X_7 sobre el crecimiento tumoral se vuelve más complejo por la observación de que la estimulación tónica, en contraposición a la farmacológica, podría tener un efecto trófico, promotor del crecimiento, en lugar de un efecto citotóxico (Geoffrey Burnstock & Di Virgilio, 2013).

A partir de estos efectos opuestos, postulamos la importancia de que el empleo un agonista del receptor (Bz-ATP) o un inhibidor podrían afectar el cambio en la proliferación inducido por ATP; analizamos el efecto de dos antagonistas del receptor P_2X_7, A-804598 (50µM) y BBG (20µM), ambos antagonistas son incapaces de bloquear la inhibición de la proliferación producida por 1000 µM de ATP o 250 µM de Bz-ATP; probablemente, debido a que las concentraciones empleadas de los antagonistas fueron insuficientes.

Una cuestión crucial, con el objetivo de relacionar un ámbito parecido al patológico, es si ATP puede acumularse en el intersticio tumoral en una concentración suficiente (rango milimolar) para activar al receptor P_2X_7; ya que es bien conocido que la estimulación *in vitro* del receptor P_2X_7 requiere de una concentración de cientos de micromoles, sino milimolar, de ATP, niveles que muchos consideran casi imposibles de alcanzar en la condición *in vivo*. Sin embargo, los mecanismo de liberación de ATP, lítico y no lítico, se han reportado que distintos tipos celulares pueden liberar cantidades considerables de ATP en respuesta a mecanismos de deformación e hipoxia, así como en respuesta mecanismos necróticos e isquemia: Pellegatti y colaboradores, utilizando como reportero al gen de la luciferasa, muestran que la concentración de ATP intraturomal se encuentra lo suficientemente elevada para activar al receptor P_2X_7 (>700 µM). (Pellegatti et al., 2008). Existe una correlación entre los niveles de ATP de las células cancerígenas y el desarrollo del cáncer a partir de hallazgos en los que la degradación inducida de ATP puede mejorar la terapia contra el cáncer, además se ha visto que la quimioterapia induce la liberación de ATP de las células tumorales, el cual desencadenaría mecanismos apoptóticos (Martins *et al*, 2009).

Uno de los mecanismo propuestos por los que el receptor purinérgico P_2X_7 inhibe la proliferación celular es la activación de la apoptosis, tras los resultados obtenidos por los histogramas, observamos que todos los experimentos en los que se trató a las células con ATP apreciamos un corrimiento de curva hacia la derecha marcando un aumento de la población celular que posee un mayor tamaño, mismas que posiblemente se encontrarían en la fase G2 de su ciclo celular; el corrimiento resulta paradójico y nos lleva a pensar que si bien ATP induce muerte celular, al ser degradado producirá adenosina, la cual es bien conocida por sus efectos proliferativos en células cancerígenas (Fernández, 2013).

Resulta poco convincente como las células tumorales expresan en su membrana plasmática el receptor purinérgico P2X7, cuya activación generalmente induce muerte celular, sabiendo que las prioridades de las células tumorales son la proliferación y la supervivencia. Ensayos de RT-PCR, muestran que el nivel de expresión del receptor P2X7 que presentan las células MDA-MB 231 es menor al observado en células tumorales poco invasivas (MCF-7) y al de las células epiteliales normales de mama (MCF-10A).

Una posible explicación de estos resultados es la presencia de un gran número de mecanismos que pueden afectar la expresión y la localización membranal del receptor P_2X_7. Primero, varias mutantes del receptor humano han sido reportados: puntos de mutación han sido identificados en su región promotora, intrones y exones, muchas de ellas asociadas con la pérdida de la función o la ganancia de la misma. Sin embargo, los datos hasta ahora presentes son inconsistentes y sus implicaciones funcionales en los cánceres epiteliales son aún desconocidas (Gorodeski, 2012).

Segundo, se conocen diez variantes como producto del corte alternativo del gen para el receptor P_2X_7, recordando que la funcionalidad del receptor depende de la formación de un trímero, que en el caso de este receptor se puede formar por una combinación homogénea o heterogénea de estas variantes, lo que resulta en la interacción de P_2X_7A con otras variantes, modulando sus acciones y limitando o incluso aboliendo los efecto del receptor nativo.

La tercera posibilidad es el mecanismo que afecta la expresión y la localización membranal del receptor P_2X_7, que involucra la regulación de la transcripción, el procesamiento y la glisocilación del receptor. La transcripción es regulada por dos grupos de elementos “cis-enhancer” localizados “río abajo de” del promotor, estas regiones contiene sitios de unión para factores de transcripción, incluidos posiblemente p300, Elk-1, E47, EIIaE, E2F y p53, quienes pueden integrar señales para mejorar y regular el crecimiento celular. E47 y p53 han sido implicados en el desarrollo de cáncer. El supresor tumoral p53 controla la expresión de genes involucrados en la regulación del ciclo y muerte celular, la expresión del receptor P_2X_7 correlaciona con los niveles de la proteína p53 y con la activación de la vía apoptótica desencadenada por p53.

La expresión a nivel membranal y la funcionalidad del receptor también depende de la glicosilación del receptor, esta es controlada por el β2-adrenoreceptor (β2-AR), ya que la activación de la proteína cinasa A (PKA) resulta en la de-glicosilación del receptor P_2X_7 mejorando su degradación. El efecto de PKA está regulado por el factor de crecimiento epidérmico (FGF); este se involucra facilitando la inhibición dependiente de fosfinositol 3-cinasa (PI3K) de la internalización del receptor β2-AR, y facilitando el reciclaje de β2-AR, así incrementando la reserva del receptor β2-AR en la membrana plasmática disponible para ser activado por su ligando. Cualquiera de estos mecanismos podría estar contrarrestando la presencia funcional del receptor P_2X_7 en las células MDA-MB-231.

Con respecto a la funcionalidad del receptor P2X7 en la línea celular MDA-MB 231, se comenzó a realizar de manera preliminar el registro electrofisiológico bajo la técnica de *patch clamp* en su configuración de célula completa en el laboratorio del Dr. Jorge Arreola en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, observándose que la presencia de altas concentraciones extracelulares de ATP (100 μM) es capaz de evocar una corriente iónica entrante cuando la célula es estimulada por un pulso de voltaje que va de 0 mV a -80 mV. El efecto observado es mimetizado al menos parcialmente por el Bz-ATP. Estas evidencias preliminares apoyan la propuesta de que las células MDA-MB 231 expresan de manera funcional el receptor P_2X_7. Resultará interesante investigar posteriormente si el bloqueo de este receptor inhibe el efecto apoptótico del ATP.

Por lo tanto, en vista de los datos expuesto en esta tesis y del estado actual de la investigación de la señalización purinérgica como blanco terapéutico, el tratamiento con ATP en contra del cáncer resulta prometedor; en este sentido, estudios preclínicos empleando tratamientos con ATP se muestran prometedores, al disminuir el volumen de tumores.

Finalmente, los resultados recabados por nuestro laboratorio y por la literatura nos permiter proponer el siguiente modelo hipotético de la señalización purinérgica en cáncer. El microambiente pericelular de una célula tumoral presenta altas concentraciones de ATP, se sabe que las células del sistema inmune presentes, así como las tumorales son capaces de liberar ATP, sin embargo el mecanismo permanece sin elucidarse. La activación del receptor A2B estimula vías que desencadenan la proliferación de las células tumorales a

través de la estimulación de la producción de AMP cíclico, la adenosina proviene de la degradación del ATP presente en medio extracelular por medio de CD39 y CD73, cuya presencia fue demostrada en la línea celular MDA-MB-231. ATP, por su parte, activa receptores purinérgicos P_2, especialmente la activación del receptor P_2X_7 produce un mecanismo a corto plazo, muerte celular probablemente por apoptosis, y uno a largo plazo, activación de la transcripción de genes proapoptóticos.

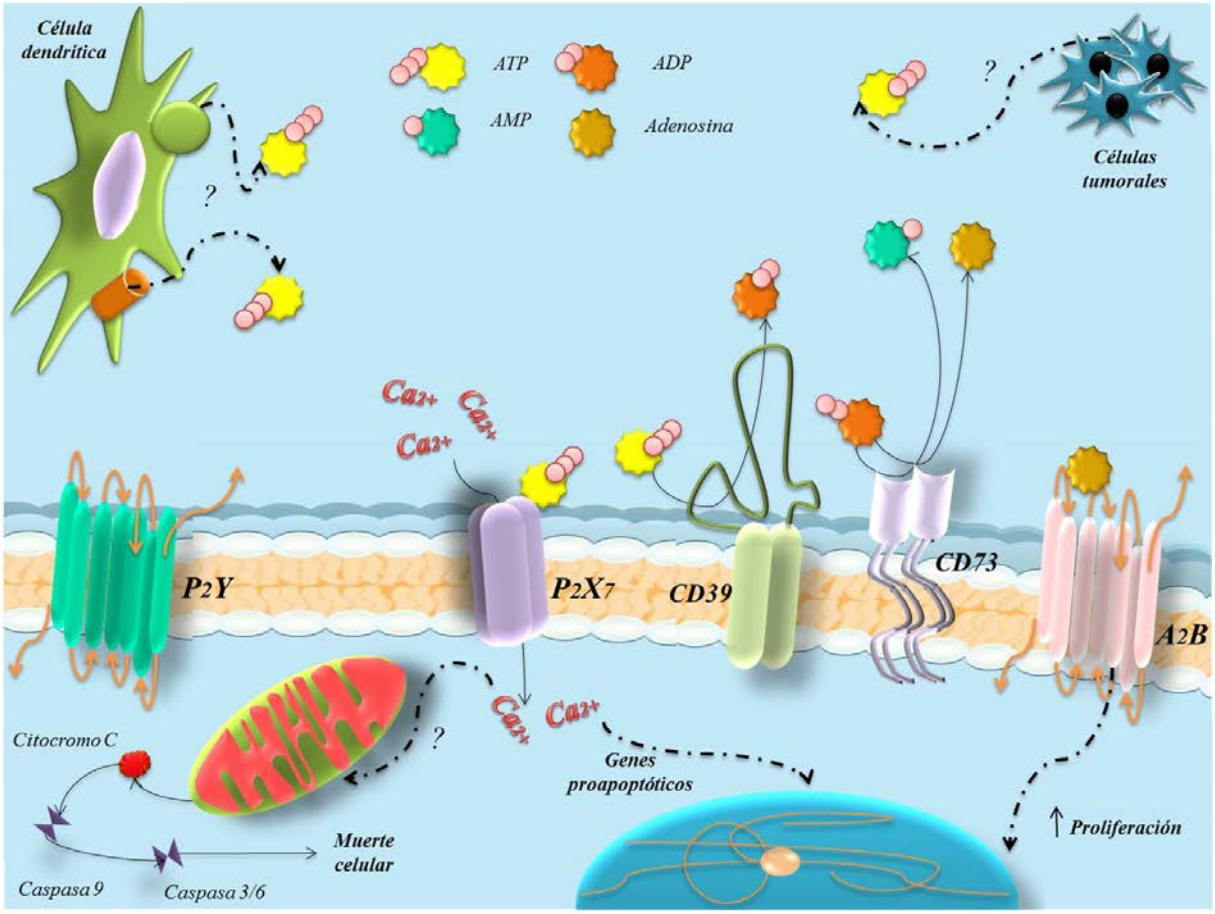


Figura 29. Modelo hipotético de la señalización purinérgica en la línea celular MDA-MB-231. Una alta concentración de ATP es encontrada en el microambiente que rodea a las células tumorales cuya fuente se localiza en las células del sistema inmune y las células cancerígenas, las cuales son capaces de liberar ATP a través de la vía no lítica, estímulos que deformen la integridad de su membrana o niveles bajos de oxígeno desencadenan esta liberación. El ATP liberado puede actuar como molécula de señalización o ser degradado por las ectonucleotidasas presentes sobre la membrana de la célula hasta adenosina, la cual puede activar a sus receptores (A_1, A_2A, A_2B y A_3) y desencadenar una vía diferente, la activación de receptor A_2B estimula la proliferación de esta línea celular. Como molécula de señalización ATP es capaz de activar receptores purinérgicos P_2 (P_2X y P_2Y), la activación del receptor P_2X_7 desencadena un mecanismo a corto plazo, inhibición de la proliferación celular probablemente por apoptosis por la vía intrínseca, y uno a largo plazo, activación de la transcripción de genes proapotóticos, posiblemente Bax, Bak, Noxa, y PUMA.

Conclusiones

- ATP extracelular inhibe la proliferación de la línea celular MDA-MB 231, el efecto es dependiente de la concentración y de la duración del tratamiento.

- Las células MDA-MB-231 expresan los ARNm que codifican para siete receptores purinérgicos P_2: P_2Y_1, P_2Y_4, P_2Y_6, P_2X_1, P_2X_4, P_2X_5 y P_2X_7.

- El efecto inhibitorio del ATP es mediado por la activación del receptor purinérgico P_2X_7, ya que es necesaria la presencia de una alta concentración de ATP para que se presente dicho efecto.

- El compuesto Bz-ATP, agonista selectivo para el receptor purinérgico P_2X_7, es capaz de inhibir la proliferación de las células MDA-MB-231, mimetizando el efecto producido por ATP.

- El nivel de expresión del ARNm que codifica para el receptor P_2X_7 es inversamente proporcional al grado de malignidad de las células provenientes de mama.

BIBLIOGRAFÍA

Abbracchio, M. P., J. M. Boeynaems, et al. (2003). "Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y14 receptor) adds diversity to the P2Y receptor family." Trends in pharmacological sciences **24**(2): 52-55.

Adinolfi, E., Raffaghello, L., Giuliani, A. L., Cavazzini, L., Capece, M., Chiozzi, P., … Di Virgilio, F. (2012). Expression of P2X7 receptor increases in vivo tumor growth. *Cancer Research*, *72*(12), 2957–69. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1947

Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E. S., & Haskó, G. (2013). CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in Molecular Medicine*, *19*(6), 355–67. doi:10.1016/j.molmed.2013.03.005

ACS. (2014). "American Cancer Society: Breast cancer." 2014.

Bean, B. P. (1990). "ATP-activated channels in rat and bullfrog sensory neurons: concentration dependence and kinetics." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **10**(1): 1-10.

Browne, L. E., L. H. Jiang, et al. (2010). "New structure enlivens interest in P2X receptors." Trends in pharmacological sciences **31**(5): 229-237.

Burnstock, G. (1990). "A basis for distinguishing two types of purinergic receptor." CelI membrane receptors for drugs and hormones: a multidisciplinary approach. **40**: 107-118.

Burnstock, G., & Knight, G. E. (2004). Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *International Review of Cytology*, *240*, 31–304. doi:10.1016/S0074-7696(04)40002-3

Burnstock, G. (2006). "Historical review: ATP as a neurotransmitter." Trends in pharmacological sciences **27**(3): 166-176.

Burnstock, G. (2007). "Purine and pyrimidine receptors." Cellular and molecular life sciences : CMLS **64**(12): 1471-1483.

Burnstock, G. (2009). "Adenosine Triphosphate (ATP)." Encyclopedia of Neuroscience **1**: 105-113.

Burnstock, G. (2009). "Purines and Purinoceptors : Molecular Biology Overview." Encyclopedia of Neuroscience **7**: 1253-1262.

Burnstock, G. (2013). "Purinergic signalling: pathophysiology and therapeutic potential." The Keio journal of medicine **62**(3): 63-73.

Burnstock, G., & Di Virgilio, F. (2013). Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signalling*, *9*(4), 491–540. doi:10.1007/s11302-013-9372-5

Burnstock, G. and C. Kennedy (1985). "Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor?" General pharmacology **16**(5): 433-440.

Burnstock, G. and G. E. Knight (2004). "Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems." International review of cytology **240**: 31-304.

Burnstock, G. and A. Verkhratsky (2012). Purinergic Signalling and the Nervous System. Germany, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Deli, T. and L. Csernoch (2008). "Extracellular ATP and cancer: an overview with special reference to P2 purinergic receptors." Pathology oncology research : POR **14**(3): 219-231.

Di Virgilio, F., Ferrari, D., & Adinolfi, E. (2009). P2X(7): a growth-promoting receptor implications for cancer. *Purinergic Signalling*, *5*(2), 251–6. doi:10.1007/s11302-009-9145-3

Drury, A. N. and A. Szent-Gyorgyi (1929). "The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart." The Journal of physiology **68**(3): 213-237.

Evans, R. J. (2009). "Orthosteric and allosteric binding sites of P2X receptors." European biophysics journal : EBJ **38**(3): 319-327.

Farrell, A. W., S. Gadeock, et al. (2010). "P2X7 receptor activation induces cell death and CD23 shedding in human RPMI 8226 multiple myeloma cells." Biochimica et biophysica acta **1800**(11): 1173-1182.

Fernández, Gallardo. (2013). La adenosine incrementa la proliferación de células de la línea celular MDA-MB-231 a través de la activación del receptor A2B. *Tesis de pregrado*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Gillespie, J. (1933). "The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid." The Journal of physiology **80**: 345-359.

Gordon, J. L. (1986). "Extracellular ATP: effects, sources and fate." The Biochemical journal **233**(2): 309-319.

Gorodeski, G. I. (2012). P2X7 receptors and epithelial cancers. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, *1*(3), 349–371. doi:10.1002/wmts.33

Guo, C., M. Masin, et al. (2007). "Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors." Molecular pharmacology **72**(6): 1447-1456.

Guzmán, O. & José, E., (2005). *Redalyc*.Cáncer de mama triple negativo, estado actual.

Hanahan, D., & Weinberg, R. a. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

Holton, P. (1959). "The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves." The Journal of physiology **145**(3): 494-504.

INEGI. (2014). "Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero), datos nacionales.".

Kawate, T., J. C. Michel, et al. (2009). "Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state." Nature **460**(7255): 592-598.

Khakh, Baljit S. (2001). Molecular physiology of p2x receptors and atp signalling at synapses. *Nature Reviews Neuroscience* 2, 165-174 (March 2001) | doi:10.1038/35058521

Li, X., Zhou, L., & Feng, Y. (2006). The P2X7 receptor: a novel biomarker of uterine epithelial cancers. … *Epidemiology Biomarkers* …, *15*(10), 1906–1913. Retrieved from http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf

Maaser, K., M. Hopfner, et al. (2002). "Extracellular nucleotides inhibit growth of human oesophageal cancer cells via P2Y(2)-receptors." British journal of cancer **86**(4): 636-644.

Martins, I., Tesniere, A., Kepp, O., Michaud, M., Schlemmer, F., Senovilla, L., … Kroemer, G. (2014). Chemotherapy induces ATP release from tumor cells. *Cell Cycle*, *8*(22), 3723–3728. doi:10.4161/cc.8.22.10026

Morrison, R. T. and R. N. Boyd (1992). Organic Chemestry, Pearson.

NCI. (2014). "National Cancer Institute, U.S. Departmet of Health and Human Services. (2012). What you need to know about: Breast Cancer. ."

North, R. A. (2002). "Molecular physiology of P2X receptors." Physiological reviews **82**(4): 1013-1067.

OMS. (2012). "International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalene Worldwide in 2012.".

OMS-2. (2013). "Cáncer de mama: prevención y control.", 2014.

OMS-3 (2014). "Cáncer. Nota descriptiva N° 297." Organización mundial de la salud

OMS-4. (2011). "Health Situation in the Americas Basic Indicators.".

OMS-5. (2012). " El cáncer de mama en las Américas."

Ongena, Kathleen & Gil, Sonia. (2014). Novel and Rapid Method to Assess Proliferative Properties of Mammalian Cells by Monitoring Cell Size Distributions. Poster Session Title: *Cell Cycle and Growth Control* 1 Program No./ Board No.: 2634/B1261
. EMD Millipore Bioscience, 17 Cherry Hill Drive, Danvers MA

Pellegatti, P., L. Raffaghello, et al. (2008). "Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase." PloS one **3**(7): e2599.

Place, A. E., S. Jin Huh, et al. (2011). "The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment." Breast cancer research : BCR **13**(6): 227.

Polyak, K. (2007). "Breast cancer: origins and evolution." The Journal of clinical investigation **117**(11): 3155-3163.

Quail, D. F., & Joyce, J. a. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*, *19*(11), 1423–37. doi:10.1038/nm.3394

Rapaport, E. and J. Fontaine (1989). "Anticancer activities of adenine nucleotides in mice are mediated through expansion of erythrocyte ATP pools." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **86**(5): 1662-1666.

Shabbir, M., C. Thompson, et al. (2008). "Effect of extracellular ATP on the growth of hormone-refractory prostate cancer in vivo." BJU international **102**(1): 108-112.

Sluyter, R. and L. Stokes (2011). "Significance of P2X7 receptor variants to human health and disease." Recent patents on DNA & gene sequences **5**(1): 41-54.

SSP. (2014). Segundo Informe de Labores de la Secretaría de Salud Pública (2013-2014), Agosto 2014.

Torres, G. E., T. M. Egan, et al. (1999). "Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners." The Journal of biological chemistry **274**(10): 6653-6659.

UICC. (2014). "Union for International Cancer Control. World Cancer Day 2014.".

Wang, M. X. and L. M. Ren (2006). "Growth inhibitory effect and apoptosis induced by extracellular ATP and adenosine on human gastric carcinoma cells: involvement of intracellular uptake of adenosine." Acta pharmacologica Sinica **27**(8): 1085-1092.

Wang, Q., L. Wang, et al. (2004). "P2X7 receptor-mediated apoptosis of human cervical epithelial cells." American journal of physiology. Cell physiology **287**(5): C1349-1358.

White, N. and G. Burnstock (2006). "P2 receptors and cancer." Trends in pharmacological sciences **27**(4): 211-217.