



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**“Influencia del líquido ascítico sobre la expresión del receptor de quimiocinas
CCR2 en la línea celular SK-OV-3”**

Tesis que presenta

Claudia Elizabeth Vera Tizatl
Médico Cirujano y Partero

**para obtener el Grado de
Maestra en Ciencias en Infectómica y Patogénesis Molecular**

Directora de la tesis: Dra. Patricia Talamás Rohana

Asesoras: Dra. Abigail Betanzos Fernández

Dra. Febe Elena Cazáres Raga

Ciudad de México

Agosto del 2017

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Patricia Talamás Rohana** por permitirme trabajar y aprender bajo su tutoría.

A la **Dra. Abigail Betanzos Fernández** por su apoyo y observaciones que fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo.

A la **Dra. Febe Elena Cazáres Raga**, por su apoyo en el desarrollo de este proyecto

Al **CONACyT** por favorecerme con el apoyo económico (número de beca:) para la realización de mis estudios de Maestría en el Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Al grupo de trabajo de la **Dra. Patricia Talamás: M. en C. Carlos Osorio Trujillo, Dra. Verónica Ivonne Hernández Ramírez, M. en C. Alfredo Toledo Leyva, M. en C. Nayely Paulina Avelar Hernández, M. en C. Dulce Rosario Alberto Aguilar, M. en C. Alejandro Constantino Jonapa, M. en C. Luis Varela Rodríguez, y Tec. en Investigación José Daniel Morales Mora.**

A **Martha Dueñas Mejía** por el apoyo secretarial brindado.

DEDICATORIAS

A mis padres **Bertha Leticia Tizatl Juárez** y **Patricio Vera Lauriano** por el enorme e incondicional apoyo que me han brindado durante mi vida, por ser mi ejemplo e inspiración, por el amor con el que me han educado y con el que me permiten continuar mi desarrollo profesional. A ustedes jamás podré terminar de expresarles mi admiración y agradecimiento.

A mis hermanas **Adriana Leticia Vera Tizatl** y **Pamela Patricia Vera Tizatl**, por los bonitos momentos vividos y por sus enseñanzas en todas aquellas áreas desconocidas para mí.

A **Ricardo Gaspar Lino** por tu cariño y por formar parte importante de mi vida, pero sobre todo por darme lo más hermoso que he conocido, la personita a quien de ahora en adelante estarán dedicados todos mis esfuerzos y representa la razón de mi existencia, nuestro hijo.

ABREVIATURAS

AGS	Activador de la señalización de proteínas G
BRCA1	Proteína de susceptibilidad a cáncer de mama tipo 1
BRCA2	Proteína de susceptibilidad a cáncer de mama tipo 2
BSA	Albúmina sérica bovina
Dil	Dilución
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetra-acético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSH	Hormona folículo estimulante
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
GRK	Cinasa de receptores acoplados a proteínas G
h	Hora
HCl	Ácido clorhídrico
Hp	Haptoglobina
HRP	Peroxidasa de rábano
IFN α	Interferón alfa
IP	Inmunoprecipitación
kDa	Kilodaltones
LA	Líquido Ascítico o Ascitis

LH	Hormona luteinizante
MCP-1	Proteína quimioattractante de monocitos 1
mg	Miligramos
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
Na ₃ VO ₄	Ortovanadato de Sodio
NaCl	Cloruro de Sodio
NaF	Fluoruro de Sodio
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
pH	Potencial de Hidrógeno
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
rpm	Revoluciones por minuto
SFB	Suero Fetal Bovino
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SKOV-3	Línea celular de carcinoma ovárico
TAM	Macrófago asociado a tumor
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa

TBS-T	Amortiguador Tris-Salino- con Tween 20
TGF α , β	Factor de Crecimiento Transformante alfa y beta
V	Voltios
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular
vol	Volumen
μ g	Microgramos
μ l	Microlitros

I. RESUMEN

Los tumores contienen además de células cancerosas, múltiples células estromales no malignas que en conjunto conforman un microambiente inflamatorio. El número y tipos de células que conforman este infiltrado están relacionados con la producción local de quimiocinas, tanto por las células tumorales como por las células estromales y contribuyen directamente a la progresión tumoral. Además otras moléculas extracelulares tales como hormonas, factores de crecimiento y citocinas, se comunican con la maquinaria nuclear reguladora de genes, a través de la interacción con receptores en la membrana celular e inician cascadas de señalización que inducen la adquisición de capacidades funcionales que permiten a las células cancerosas sobrevivir, proliferar y diseminarse; estas funciones son adquiridas en diferentes tipos de tumor a través de distintos mecanismos y en diversos momentos durante el transcurso de la tumorigénesis. Dentro de estas capacidades funcionales se incluyen el mantenimiento de la señalización proliferativa, la evasión de supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis, activación de la invasión y metástasis. El estudio de receptores de quimiocinas como CCR2, resulta de gran interés por su participación en el proceso de migración al ser activado por alguno de sus múltiples ligandos y favorecer las capacidades funcionales mencionadas. La sobreexpresión de la proteína de fase aguda Haptoglobina tanto en el tejido tumoral como en el líquido de ascitis, también ha sido asociada al proceso metastásico, ya que se ha sugerido que facilita la diseminación de células tumorales y la colonización metastásica subsecuente. Por lo que el objetivo de este proyecto fue analizar la interacción Haptoglobina-CCR2 en la línea celular de cáncer de ovario SK-OV-3. El estudio de esta interacción proveerá herramientas importantes para discernir que moléculas participan en el desarrollo tumoral del cáncer de ovario, la cual es una de las principales causas de mortalidad a nivel nacional debido a su difícil detección en estadios tempranos.

II. ABSTRACT

In addition to cancerous cells, tumors contain multiple non-malignant stromal cells that construct an inflammatory microenvironment. The number and type of cells that constitute the infiltrate are related with the local production of chemokines by both tumoral and stromal cells. Other molecules such as hormones, growth factors, and cytokines communicates with the regulatory nuclear machinery through their interaction with cellular membrane receptors triggering signaling pathways responsible for the acquisition of functional capabilities named “hallmarks”. These hallmarks allow the surviving, proliferation and spreading of cancerous cells. The sustaining of the proliferative signaling, evading growth suppressors, resisting cell death, angiogenesis, invasion and metastasis are included within the hallmarks. The study of chemokine receptors activation such as CCR2 is important by its participation during migration process. Overexpression of the acute phase protein Haptoglobin in the tumor and in ascitic fluid provides tumoral cell spreading and metastatic colonization, therefore it has been associated with the metastatic process. The aim of this project was to analyze the haptoglobin-CCR2 interaction in the ovarian cancer cell line SK-OV-3. The study of the interaction will provide useful tools in the discerning of molecules involved in the tumoral development of the ovarian cancer, the main mortality cause in Mexico between women because of its difficult detection in earlier stages.

INDICE DE CONTENIDO

I.	RESUMEN.....	7
II.	ABSTRACT.....	8
III.	INTRODUCCIÓN.....	11
1.	Generalidades.....	11
	1.1 Cáncer epitelial de ovario	
	1.1.1 Epidemiología del cáncer de ovario	
	1.1.2 Tumorigénesis ovárica	
	1.2 Microambiente tumoral	
	1.2.1 Haptoglobina	
	1.2.2 Quimiocinas y cáncer	
	1.2.3 CCR2 en cáncer de ovario	
2.	Antecedentes.....	24
	2.1 Análisis de proteínas presentes en el líquido ascítico	
	2.2 Participación de CCR2 en el proceso metastásico	
	2.3 Relación entre Haptoglobina y CCR2	
IV.	JUSTIFICACIÓN.....	27
V.	HIPÓTESIS.....	28
VI.	OBJETIVOS.....	29
VII.	ESTRATEGIA METODOLÓGICA.....	30
VIII.	METODOLOGÍA.....	33
IX.	RESULTADOS.....	36
X.	DISCUSIÓN.....	54
XI.	RESUMEN DE RESULTADOS.....	57
XII.	CONCLUSIÓN.....	58
XIII.	PERSPECTIVAS.....	59
XIV.	REFERENCIAS.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Tasa de incidencia y mortalidad del cáncer de ovario alrededor del mundo 2012.....	14
Figura 2: Patrones de unión ligando-receptor de los receptores de quimiocinas humanos.....	25
Figura 3: Cambio morfológico inducido en células SK-OV-3.....	36
Figura 4: Inducción de rearrreglo de citoesqueleto de actina en células SK-OV-3.....	37
Figura 5: Expresión de CCR2 en células SK-OV-3.....	38
Figura 6: Distribución subcelular de CCR2 en células SK-OV-3.....	39
Figura 7: Expresión y distribución subcelular de CCR2 en SK-OV-3.....	40
Figura 8: Tile scan de inmunofluorescencia en células SK-OV-3 tratadas con 500 µg de Hp.....	41
Figura 9: Tile scan de inmunofluorescencia en células SK-OV-3 tratadas con MCP-1.....	42
Figura 10: Ensayo de Co-IP analizado por SDS-PAGE 15%.....	43
Figura 11: Western blot con el mAbCKR-2B en el ensayo de Co-IP.....	44
Figura 12: Western blot anti-Hp ensayo de Co-IP.....	45
Figura 13: Ensayo de Overlay para el estudio de la interacción CCR2-Hp.....	46
Figura 14: Inducción de la expresión de Hp en células SK-OV-3 por el tratamiento con diferentes líquidos ascíticos.....	48
Figura 15: Western blot mAb26E1.....	49
Figura 16: Ensayo de herida y cierre en células SK-OV-3 mantenidas en medio de cultivo.....	50
Figura 17: Ensayo de herida y cierre en células SK-OV-3 estimuladas con Hp.....	51
Figura 18: Ensayo de herida y cierre en células SK-OV-3 estimuladas con LA 1.....	52
Figura 19: Ensayo de herida y cierre en células SK-OV-3 estimuladas con LA 2.....	53

III. INTRODUCCIÓN

1. Generalidades

1.1. Cáncer epitelial de ovario

El cáncer de ovario es la segunda neoplasia del aparato genital femenino en frecuencia, tras el cáncer de endometrio. Sin embargo, es la principal causa de mortalidad por cáncer ginecológico. Este padecimiento ha sido asociado con distintos factores de riesgo entre los que cabe resaltar la edad, ya que, el riesgo de padecer cáncer de ovario aumenta en forma proporcional a medida que ésta avanza.

La obesidad representa otro factor de riesgo; se ha observado que aquellas mujeres con un índice de masa corporal ≥ 30 tienen un mayor riesgo de padecer cáncer de ovario. El embarazo a término antes de los 26 años presenta un menor riesgo para la aparición de cáncer de ovario en comparación con mujeres que tienen su primer embarazo después de los 35 años o con aquéllas que nunca tuvieron un embarazo. El uso de los anticonceptivos orales brinda un menor riesgo después de 3 a 6 meses de tratamiento, esta protección continúa varios años después de suspender las píldoras. Sin embargo, el uso de medicamentos para la fertilidad como Citrato de clomifeno, por más de un año, puede aumentar el riesgo de presentar la enfermedad. La ligadura tubárica puede reducir la probabilidad de cáncer de ovario en hasta dos tercios. La histerectomía también parece reducir el riesgo de cáncer de ovario alrededor de un tercio.

Aproximadamente de 5 a 10 por ciento de los casos de cáncer de ovario pertenecen a los síndromes de cáncer familiar, ocasionados por mutaciones en ciertos genes como BRCA1 o BRCA2. Se calcula que, en las mujeres con el BRCA1, el riesgo de cáncer de ovario en el transcurso de sus vidas es de entre 35% y 70%; para las mujeres con mutaciones BRCA2, el riesgo ha sido estimado entre 10% y 30% para la edad de los 70 años [1].

El cáncer de ovario puede causar diferentes signos y síntomas en su mayoría inespecíficos que también pueden ser causados por enfermedades benignas. Los síntomas más comunes incluyen: inflamación, dolor pélvico o abdominal, dificultad

para ingerir alimentos o sensación rápida de plenitud, y síntomas urinarios, tales como urgencia.

El origen y la patogenia son poco entendidos ya que la lesión original que da lugar al cáncer de ovario no ha sido identificada, Habitualmente las etapas iniciales del cáncer suelen cursar sin síntomas, o con síntomas muy leves que pasan desapercibidos y se confunden con procesos benignos. En la cavidad abdominal el tumor puede crecer y diseminarse de forma silente, de manera que cuando causa síntomas ya suele estar diseminado. Incluso los primeros síntomas en las etapas avanzadas son habitualmente bastante vagos en forma de molestias inespecíficas abdominales, por lo que es frecuente que sean ignorados o confundidos con procesos benignos como dispepsia. A medida que el tumor crece pueden comenzar a aparecer algunos síntomas como pérdida de apetito, sensación de plenitud abdominal tras la comida, o pérdida de peso. En general, se suele acumular líquido en el abdomen causando ascitis, que puede ser muy importante, y causar distensión de la cavidad abdominal. El cáncer de ovario es por tanto difícil de diagnosticar precozmente, y ésta es la principal causa de su elevada mortalidad [2].

El ovario puede originar tumores histológicamente muy diferentes y la clasificación resulta difícil debido a que la patogenia es menos clara en comparación con otros tumores. La Organización Mundial de la Salud clasifica los tumores ováricos de acuerdo con el tejido de origen en:

- Tumores de epitelio superficial
 - o Tumores serosos
 - o Tumores mucinosos
 - o Tumores endometrioides
 - o Tumores de células claras
- Tumores de los cordones sexuales-estroma
- Tumores de células germinales

El cáncer epitelial de ovario es el más frecuente y representa 85% de todos los casos, especialmente en mujeres entre 45 y 59 años de edad. Los tumores de células germinales representan el 10% y son más frecuentes en mujeres jóvenes alrededor de 30 años. Los tumores estromales son escasos y representan el 2 a 3% [3].

El cáncer de ovario representa una enfermedad compleja que se desarrolla desde múltiples sitios, los cuales interesantemente son en su mayoría ajenos a este órgano; una de las hipótesis sostiene que puede originarse del epitelio ovárico superficial donde las células involucionan dentro del ovario y forman quistes, al ser sometidas al microambiente estromal junto con la inflamación asociada al proceso cíclico de la ovulación se propone que la transformación maligna es favorecida. Otro origen celular propuesto para explicar los distintos tipos histológicos, son las trompas de Falopio que representan una vía de acceso hacia los ovarios, similar a lo que ocurre en la menstruación retrógrada que puede promover la endometriosis. Aunque ninguna de las teorías existentes parece incluir de forma adecuada todos los aspectos de la carcinogénesis ovárica [4].

Una característica significativa del microambiente es la comunicación entre las células cancerosas y las células del estroma neoplásico, ya que, la elevada expresión de mediadores de la inflamación, conduce a una alteración en la señalización quimiocina-receptor que contribuye a la inflamación y malignidad [5]. La señalización a través de receptores de quimiocinas es especialmente importante en el proceso metastásico ya que ejercen efectos tanto en las células cancerosas de forma directa guiando su migración y la expresión de metaloproteinasas, así como de forma indirecta reclutando células con actividad pro-tumorígenica, TAMs (Macrófagos asociados a tumor). Por lo tanto, el desarrollo de cáncer depende de una proliferación potenciada y apoptosis disminuida, y para crecer de forma eficiente, estas células cancerosas dependen de un microambiente compuesto de células estromales (células endoteliales, fibroblastos, células del sistema inmune y epiteliales), este microambiente tumoral se encarga del mantenimiento del tumor, el comienzo del proceso metastásico y el inicio de la angiogénesis [6].

1.1.1. Epidemiología del cáncer de ovario

En el mundo se diagnostican cerca de 238,719 nuevos casos de cáncer epitelial de ovario y en México se estiman cerca de 4000 casos nuevos cada año. Los países que tienen una mayor frecuencia son los europeos, EUA y Canadá; seguidos por México, Colombia, Uruguay y Australia; en tercer lugar, de frecuencia, se encuentran Brasil y Argentina; es menos común en los países africanos y del sur de Asia [7].

En México el cáncer de ovario presenta una tasa de incidencia de 4.6 a 7.3 por cada 100,000 mujeres por año y una tasa de mortalidad de 3.3 a 4.8 por cada 100,000 mujeres por año; ocupa el segundo lugar entre los de tipo ginecológico y como en los distintos tipos de cáncer, la detección temprana es crítica para mejorar la supervivencia, ya que, si es detectado durante la etapa I e incluso en la II, el grado de supervivencia es alto. Sin embargo, la mayoría de los casos son detectados durante las etapas III y IV con un rango de supervivencia a cinco años que ha sido modificado a través del tiempo de 37% en 1976 y 41% en 1985 a 53% en el año 2000, esto como resultado de mejores técnicas diagnósticas y quirúrgicas, así como de quimioterapia más efectiva. Considerando que la detección temprana es en parte difícil debido a sus síntomas inespecíficos que son confundidos frecuentemente con trastornos gastrointestinales. El diagnóstico suele realizarse posterior a la menopausia, la edad promedio de presentación es a los 63 años, 16% se diagnostica entre los 40 y 44 años [8].

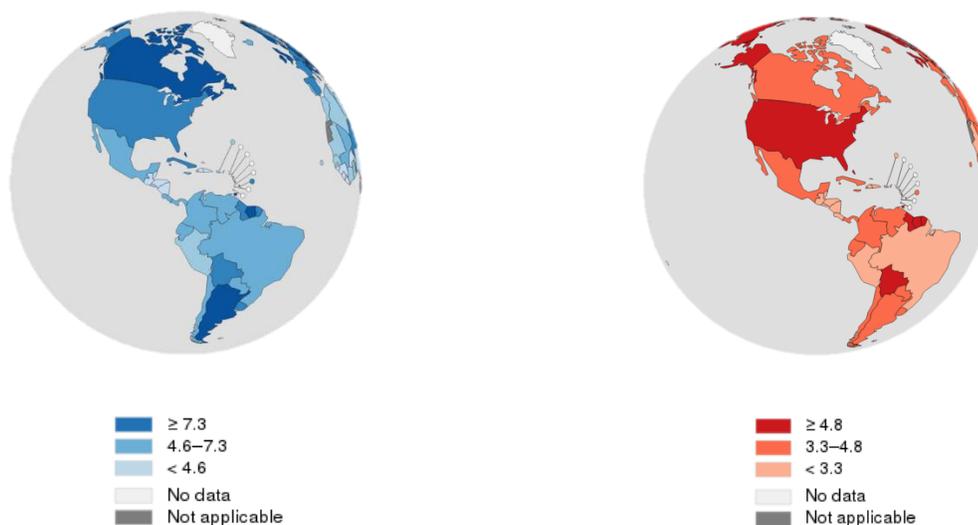


Fig. 1 Tasa de incidencia (azul) y mortalidad (rojo) del cáncer de ovario alrededor del mundo 2012 (8)

1.1.2. Tumorigénesis ovárica

Se propone que la tumorigénesis involucra 4 etapas, las etapas 1, 2 y 3 ocurren durante la edad reproductiva mientras que la etapa 4 ocurre durante la edad peri y postmenopausica asociado con atrofia ovárica.

Etapas 1. Migración y reclutamiento a los ovarios

Se sabe que durante la ovulación, la ruptura de los folículos ováricos para liberar al oocito y el proceso de reparación que ocurre de forma cíclica, crea un microambiente inflamatorio local, en el cual se producen citocinas y factores de crecimiento, haciendo al ovario una fuente de factores quimiotácticos que reclutan células extraováricas premalignas y/o malignas así como células normales. Algunas de las citocinas proinflamatorias asociadas a la ovulación son TNF α y CXCL2 que además pueden estimular los niveles de RNAm de CXCR4 en las células cancerosas, lo que se ha asociado con la progresión tumoral.

Etapas 2. Implantación y establecimiento en los ovarios

Además de la secreción de quimiocinas, otro evento clave en la ruptura del epitelio superficial es la exposición del estroma ovárico subyacente. Se ha observado que las células cancerosas se adhieren mejor a las células estromales que a las epiteliales debido al tipo de proteínas que componen la matriz extracelular (Colágena IV y Tenacina C) y a la elevada expresión en las células cancerosas de receptores para dichas proteínas como las integrinas $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha V\beta 6$. Algunos factores funcionan además como un nicho que promueve la supervivencia de células implantadas, tal es el caso del cuerpo lúteo. Si las células implantadas poseen un fenotipo maligno tal microambiente puede modular su fenotipo, crecimiento y diferenciación; de hecho citocinas presentes en los ovarios post-ovulatorios como IL-6, IL-8 CCL-2/MCP-1 y CCL-5 han mostrado inducir crecimiento *in vitro* de líneas celulares de cáncer de ovario y la expresión de factores angiogénicos como VEGF. Este microambiente pro inflamatorio también potencia los errores replicativos en las células implantadas, lo que puede conducir a la perpetuación de daño al DNA y contribuir a la posterior transformación maligna. Lo que sugiere que si las células implantadas no poseen un

fenotipo maligno, el microambiente inflamatorio que acompaña cada ciclo ovulatorio puede favorecer la eventual transformación maligna [9].

Etapa 3. Inducción de un cáncer en estado latente

La inducción de latencia y la subsecuente reactivación no solamente son desencadenadas por programas celulares intrínsecos, dependen también de microambientes o nichos especializados. El nicho ovárico que es rico en factores de mantenimiento de la inactividad celular, necesarios en el mantenimiento de un estado quiescente de los folículos ováricos de forma normal, puede proveer a las células malignas las ventajas de supervivencia, escape de la vigilancia inmunológica y mantenimiento de un fenotipo troncal. Una de las citocinas producidas en el ovario es TGF β , particularmente TGF β 2 es sobre-regulada durante la ovulación para el control del crecimiento folicular al estimular la expresión de los receptores de las hormonas FHS y LH, también ha mostrado inducir un estado de latencia en las células tumorales a través de la activación de vías de señalización como MAPK p38 α/β que induce la expresión de p27, así como, la desregulación de la cinasa dependiente de ciclina 4 en las células tumorales [10].

Etapa 4. Expansión y progresión tumoral

Si los precursores malignos entran y permanecen en un estado de latencia durante la edad reproductiva es posible que la atrofia asociada con la menopausia pueda conducir a la pérdida del nicho ovárico y consecuentemente a la salida de las células malignas de este estado. Durante la menopausia los folículos se vuelven atróficos conduciendo a la disminución estrogénica que consecuentemente promueve la secreción desde la adenoipófisis de FHS y LH, los niveles elevados de estas gonadotropinas han sido asociados con el cáncer de ovario sobre todo con la transición epitelilal mesenquimal. Las gonadotropinas pueden prommover el crecimiento celular a través de la vía IL-6/STAT3 así como también mediante la activación de la oncoproteína gankyrina que conduce a la progresión incontrolada del ciclo celular y proliferación mediada por la Ciclina D1. Aun más, FSH y LH pueden incrementar de forma significativa la expresión de metaloproteinasas de matriz MMP-2 y MMP9 en líneas celulares de cáncer de ovario potenciando su invasividad [11].

1.2. Microambiente tumoral

El microambiente tumoral crea y establece las características de crecimiento, morfología e invasividad de un tumor maligno. Está formado por un tejido complejo que contiene matriz extracelular, células tumorales y no tumorales, una red de señales por citocinas, quimocinas, factores de crecimiento, proteasas, que controlan la comunicación autocrina y paracrina entre las células individuales, haciendo posible la progresión tumoral [12].

El microambiente inflamatorio inducido por las células tumorales afecta la función inmunoefectora a través de células inmunosupresoras del tipo de macrófagos asociados al tumor (TAM), células mieloides inmaduras, linfocitos T reguladores ($CD4^+$, $CD25^+$) que suprimen la presentación del antígeno asociado al tumor, así como también interfieren con la función de las células T citotóxicas mediante la inhibición por la liberación de gránulos citolíticos, etc. Es también posible que suceda a través de la reducción del número de células dendríticas, esenciales para iniciar y mantener una respuesta inmune antitumoral. Las células T reguladoras y algunos macrófagos son productores de IL-6, IL-10 y TGF β que favorecen también el ambiente inmunosupresor y contribuir así con la progresión tumoral y metástasis [13].

Las proteínas de fase aguda, como la proteína C reactiva, la proteína amiloide A sérica y Haptoglobina desempeñan un papel importante en la inducción de este medio inflamatorio, y son quimiotácticas para otras células inflamatorias tales como los mastocitos y linfocitos T [14].

El tipo y número de células que forman al infiltrado leucocitario en los tumores sólidos está relacionado con la producción local de quimiocinas tanto por las células tumorales como por las células estromales. En el cáncer epitelial de ovario se encuentra una red de quimiocinas CC y CXC, tanto en el tumor sólido como en el líquido de ascitis asociado. El infiltrado predominante son macrófagos y linfocitos T $CD8^+$. Específicamente CCL2 se localiza en áreas epiteliales del tumor y sus niveles de expresión correlacionan con el número de linfocitos y macrófagos que se localizan en la misma área. CCL5 se localiza con los linfocitos infiltrantes de tumor y sus concentraciones reflejan la extensión de la infiltración linfocitaria T $CD8^+$. En este

padecimiento varias quimiocinas a niveles desde pico a nanomolar (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CCL22, CXCL2 y CXCL12) se encuentran en el líquido de ascitis. Los leucocitos infiltrantes en el cancer epitelial de ovario muestran un perfil de receptores de quimiocinas limitado, siendo en su mayoría CCR1 el receptor expresado. Las condiciones fisiológicas, tales como hipoxia, pueden alterar el perfil de receptores de quimiocinas y la respuesta a las mismas en el microambiente tumoral, en el líquido de ascitis los leucocitos expresan un amplio rango de receptores de quimiocinas que es comparable a aquéllos encontrados en leucocitos circulantes en el torrente sanguíneo periférico. Esto puede reflejar las diferencias en el microambiente entre el tumor ovárico sólido y el líquido de ascitis [12].

1.2.1. Haptoglobina

La haptoglobina es una proteína de unión de hemoglobina presente en el plasma (0.3 a 3 mg/ml) y es sintetizada principalmente por el hígado, pero también por otros tejidos como pulmón, bazo, riñones, piel, tejido adiposo, cerebro y ovario. Esta α_2 -sialoglicoproteína es importante en múltiples procesos fisiológicos al interactuar con diferentes proteínas tales como la hemoglobina plasmática libre. La haptoglobina forma un complejo estable con la hemoglobina que junto con el receptor CD163, presente en macrófagos, promueve la rápida eliminación del hierro reactivo. Este mecanismo previene los efectos oxidativos causados por la permanencia del hierro en circulación [15].

El humano presenta tres fenotipos de Hp (Hp 1-1, Hp 2-2 y Hp 2-1), debido a la presencia de dos alelos génicos (HP1 y HP2) que surgen por duplicación intragénica del alelo HP1. Los genes que codifican esta proteína tienen su locus en el brazo largo del cromosoma 16 (16q22), el loci que corresponde a las cadenas α y β están unidos por lo que una sola molécula de mRNA genera una cadena polipeptídica larga que posteriormente se dividirá en dos cadenas de Hp [16].

La haptoglobina presenta dos cadenas ligeras alfa (α_1 , 9 kDa y α_2 , 18 kDa) y dos cadenas pesadas beta (β , 38 kDa), unidas por puentes disulfuro intercatenarios, se asocian para formar la llamada Hp monomérica (Hp1). La Hp dimérica está formada por estas cadenas $\alpha\beta$ unidas covalentemente por un puente disulfuro entre el residuo de cisteína 15 de cada cadena β [17].

Posee actividad en diferentes procesos biológicos, por ejemplo en el monitoreo de las respuestas contra infecciones y procesos tumorales. De estos últimos, se ha asociado sobre todo a distintos tipos de cáncer como el de vejiga, pulmón, mama, leucemias y linfomas en los cuales se ha observado un efecto angiogénico, antiinflamatorio e inmunomodulador [18].

También ha sido involucrada en la transición epitelial mesenquimal. En el cáncer de ovario se encuentra una elevada concentración tanto en el tejido tumoral como en líquido de ascitis e incluso en el suero de pacientes, por lo que se cree que, aunque la Hp inicialmente puede ser distribuida del hígado a la cavidad peritoneal como respuesta a un proceso inflamatorio, en algún punto el microambiente de las células tumorales presentes en el líquido de ascitis puede inducir la expresión y secreción de Hp, que a su vez podría inducir la expresión del receptor de quimiocinas CCR2 [13].

Existen distintos patrones de expresión de Hp en los diferentes líquidos de ascitis de las pacientes afectadas con esta patología, basado en las isoformas de subunidad alfa que integra a la Hp [19], al mismo tiempo se ha observado que esta subunidad presenta un grado diferencial de fucosilación que está relacionado con el estadio clínico. Es decir la Hp altamente fucosilada se relaciona con un estadio avanzado, generalmente en estadio IV, resultando en un posible biomarcador de la progresión tumoral [13, 20].

1.2.2. Quimiocinas y cáncer

Las funciones asignadas hoy en día a las quimiocinas ha superado ampliamente el concepto de citocina quimioatrayente, y de hecho algunas de sus funciones quedan fuera del ámbito inmunológico. Se sabe que tanto las quimiocinas como sus receptores se expresan en una gran variedad de células no hematopoyéticas y que la función de las quimiocinas va más allá de su papel en la fisiología leucocitaria, aunque es en este último modelo donde más se han estudiado y donde se las ha relacionado con otras funciones diferentes a las de la quimioatracción. Las quimiocinas o citocinas quimioatrayentes son una familia de proteínas de bajo peso molecular (8 a 10 kDa), con un alto grado de homología, y que presentan a lo largo de su secuencia 4 residuos de cisteína. En función de sus propiedades estructurales y de la localización cromosómica de sus respectivos genes se reconocen clásicamente cuatro grandes grupos, CXC o α -quimiocina, CC o β -quimiocinas, C o γ -quimiocinas y CXC₃ o δ -quimiocinas. El grupo de las CXC presentan un residuo aminoacídico cualquiera (X) intercalado entre las dos primeras cisteínas, mientras que en el grupo de las CC, estos dos primeros residuos de cisteína se encuentran adyacentes. Estas diferencias estructurales coinciden con una diferente localización cromosómica (cromosoma 4q13 para las CXC y 17q11 y 12 para las CC) y con una actividad diferencial. Aunque actualmente se ha descrito que tanto las quimioquinas de la familia CXC como las de la CC son capaces de actuar sobre tipos celulares muy variados, tanto dentro del sistema leucocitario como fuera de él, en un principio se afirmó que las quimiocinas CXC actuaban sobre los neutrófilos, mientras que las CC tenían como células diana monocitos y linfocitos T [21].

Los datos existentes sobre la estructura terciaria de las quimiocinas revelan que todas ellas forman dímeros, siendo globulares los de la familia CXC y elongados los de la CC. De forma general, se distingue la presencia de tres láminas beta y una alfa hélice en el extremo carboxilo terminal. La dimerización se produce precisamente por esa zona C-terminal y es similar tanto en las quimiocinas que pertenecen a la familia CXC como a la CC. La relevancia fisiológica de la dimerización radica en que la concentración a la que las quimiocinas son biológicamente activas es mucho menor

que la necesaria para su dimerización, lo que sugiere que su forma activa sería la monomérica [22].

Dentro de las múltiples acciones en las que las quimiocinas juegan un papel relevante destacan la migración celular, la inflamación, la infiltración tisular y la angiogénesis. El infiltrado leucocitario en el tejido tumoral, es una característica del cáncer y muchos cánceres humanos poseen una compleja red de quimiocinas que controla la cantidad y fenotipo de este infiltrado. Como se ha mencionado anteriormente la red de quimiocinas predominante en el cáncer de ovario esta integrada por las quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CCL22, CXCL2 y CXCL12 [23, 24].

Como ocurre en el caso de las quimiocinas, los receptores también pueden agruparse en dos grandes familias, CCR y CXCR, que interaccionan con quimiocinas de la familia CC y CXC respectivamente. La mayoría de los ligandos se unen a más de un receptor y la mayoría de los receptores reconocen a más de un ligando. La promiscuidad que presentan los receptores para las quimiocinas de la familia CC, no se mantiene en la familia CXC, en este caso se da una mayor especificidad. En un inicio las diferentes quimiocinas uniéndose a un mismo receptor fueron referidas como funcionalmente redundantes, sin embargo, las diferencias entre sus efectos *in vivo* se reconocieron posteriormente [22].

1.2.3. CCR2 en cáncer de ovario

El receptor de quimiocinas CCR2 resulta de gran interés ya que ha sido implicado en enfermedades inflamatorias y cardiovasculares. Más aún son de nuestro interés, las funciones potenciales en otras enfermedades como el cáncer, en especial su participación en el cáncer de ovario. Se ha propuesto que posee un efecto indirecto en la progresión tumoral controlando el reclutamiento de células inmunológicas, al encontrarse sobre regulado en las células cancerosas, en las cuales estimula además la supervivencia y motilidad a través de la unión de su ligando CCL2. La exposición crónica de leucocitos a concentraciones elevadas de quimiocinas en el microambiente tumoral puede activar macrófagos tipo 2 los cuales a su vez liberan citocinas inmunosupresoras como IL-10 y factor de crecimiento transformante β (TGF- β), los macrófagos tipo 2 también liberan MCP-1/CCL2 que puede contribuir a la inmunidad polarizada TH2. En suma el microambiente tumoral puede inhibir la migración y función de células dendríticas tipo 1 las cuales regulan la diferenciación TH1 y esto puede además suprimir respuestas inmunes específicas, como resultado las células dendríticas permanecen inmaduras y la presentación antigénica no ocurre [6].

Los genes que codifican a este receptor se encuentran en el brazo corto del cromosoma 3 (3p21.31) y presenta 2 isoformas como resultado de “splicing” alternativo de los extremos carboxilo terminal. El peso molecular predicho con base en su secuencia aminoacídica es de 41 kDa, sin embargo, éste es alterado por modificaciones postraduccionales que experimenta el receptor antes de ser expresado en la superficie celular. Dentro de las modificaciones pueden mencionarse, sulfatación y N-glicosilación. La sulfatación es la adición de un grupo sulfato en el residuo de tirosina 26, el cual se encuentra dentro de una región consenso de 6 aminoácidos en el extremo amino terminal, la adición de este grupo va desde el 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato, que es un derivado de la adenosina monofosfato, y que se encuentra fosforilado en la posición 3' y posee además un grupo sulfato unido al fosfato 5'. Estas modificaciones postraduccionales tienen lugar en el trans Golgi justo antes de que el receptor sea exportado a la superficie celular y modifica su peso molecular de 41 kDa a 50 kDa [25].

2. Antecedentes

2.1. Análisis de las proteínas presentes en líquido ascítico

En nuestro laboratorio se llevó a cabo el análisis de la expresión diferencial de proteínas en líquido ascítico proveniente de pacientes con cáncer de ovario. Mediante electroforesis en dos dimensiones y espectrometría de masas se detectaron proteínas que probablemente están involucradas en procesos como proliferación y metástasis. Estas proteínas altamente expresadas, Haptoglobina (Hp) y Transtiretina, particularmente una forma glicosilada de Hp producida por fucosilación, cuyos niveles están incrementados incluso en suero de estas pacientes, podrían resultar un buen biomarcador relacionado con el estadio de la enfermedad [20]. También se han observado alteraciones en los niveles de expresión de las cadenas α de la Hp en pacientes tanto con cáncer de ovario como en otros tipos de cáncer como el de cabeza y cuello [19], pulmón [16] e hígado [26].

2.2. Participación de CCR2 en el proceso metastásico

El receptor CCR2 posee 2 isoformas, CCR2A y CCR2B, resultado de “splicing” alternativo que difieren en su dominio C-terminal por 50 pares de bases. Siendo predominante CCR2B y altamente expresado por monocitos y linfocitos Natural Killer (LcNK), es un receptor promiscuo que puede reconocer quimiocinas de estructura similar a CCL2 (MCP-2 / CCL8, MCP-3 / CCL7 y MCP-4 / CCL13) (Fig. 2), cuyas interacciones conducen a distintas respuestas biológicas ya sea migración, invasión, proliferación o reclutamiento [27].

CCR2 pertenece a uno de los grupos más grandes y diversos, la familia de Receptores acoplados a proteínas G (GPCR), cuyos miembros son proteínas que poseen una sola cadena polipeptídica con un extremo amino extracelular y un extremo carboxilo intracelular, y que además contiene 7 alfa-hélices transmembranales interconectadas por 3 asas intracelulares y 3 asas extracelulares. Los GPCRs están acoplados a su vez, a diversos efectores tales como: proteínas heterotriméricas que unen nucleótidos de guanina (proteínas G), reguladores de la señalización de las proteínas G (RGS), activadores de la señalización de las proteínas G (AGS), canales iónicos, arrestinas,

cinastas de receptores acoplados a proteínas G (GRK), y muchas otras proteínas. El acoplamiento de los GPCRs a diferentes clases de proteínas G determina las vías de señalización que serán activadas, hay más de 20 diferentes subunidades $G\alpha$, las cuales han sido agrupadas de acuerdo con la identidad de su secuencia y a su acoplamiento a distintos efectores; por lo tanto, dependiendo de la subunidad $G\alpha$ presente en la proteína G, es que, se han clasificado en 4 principales subfamilias: $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i/0}$, $G_{\alpha q/11}$, $G_{\alpha 12/13}$. Se ha mencionado con anterioridad que distintas quimiocinas pueden unirse a CCR2, aunque de forma menos eficiente que CCL2. Sin embargo, esta unión desencadena la activación preferente de las subunidades $G_{\alpha i/0}$ y $G_{\alpha 12}$ pero no $G_{\alpha 13}$ [23].

La intercomunicación entre las proteínas G heterotriméricas ($G_{\alpha 12}$) y las proteínas G pequeñas (Rho, Rac y Cdc42), explica los diversos cambios en las dinámicas del citoesqueleto que ocurren posterior a la activación de los GPCRs. La transducción de estas señales utiliza diversos elementos celulares para poder ejecutar sus acciones, entre estos elementos, el citoesqueleto es uno de los más importantes, en el cual ocurre una intercomunicación entre las redes de microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermedios que da como resultado la reorganización del mismo. Esta reorganización del citoesqueleto además de la pérdida de uniones intercelulares y de la polaridad apical-basal dan lugar a un fenotipo mesenquimal, proceso conocido como “transición epitelial-mesenquimal”, el cual ha sido implicado en la progresión del cáncer al originar células capaces de invadir y diseminarse dando lugar a la metástasis [6].

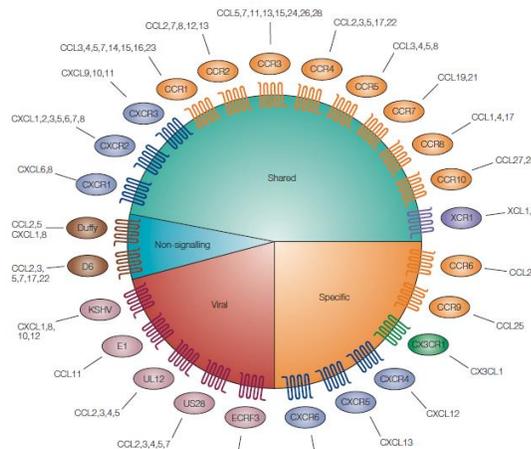


Figura. 2 Patrones de unión ligando-receptor de los receptores de quimiocinas humanas [6].

2.3. Relación entre Haptoglobina y CCR2

Se ha propuesto que la Hp es capaz de desplazar la unión de MCP-1/CCL2 con CCR2 de forma dosis dependiente a concentraciones de 2 mg/ml, lo que sugiere que esta interacción se lleva a cabo con una baja afinidad ya que MCP-1 se une a concentraciones de 50 ng. La expresión de Hp ha sido asociada al proceso metastásico, por el reclutamiento de monocitos/macrófagos, por un mecanismo similar mediante el cual CCL2 señala facilitando la diseminación de células tumorales y la colonización metastásica subsecuente [14].

Para determinar la función oncogénica de Haptoglobina y CCR2, se han llevado a cabo distintos ensayos como la expresión de este receptor en líneas celulares de cáncer de ovario, como las células SK-OV-3 mediante la estimulación con Haptoglobina y la determinación de esta expresión mediante Western blot [13].

De igual forma, también se han reportado análisis funcionales como ensayos de migración e invasividad en cámaras transwell, evaluación de la migración mediante ensayos de herida y cierre, todos ellos indicando que las células que expresan este receptor no solamente migran más que las células control sino que también invaden más el Matrigel y más rápido comparado con los controles gracias a la sobreexpresión de metaloproteinasas, en especial MMP2 y MMP9 [28].

IV. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de ovario es una enfermedad que afecta principalmente a mujeres mayores de 40 años, la cual es difícilmente detectada sino hasta los estadios tardíos, caracterizados por la acumulación de líquido en la cavidad peritoneal o también denominado ascitis maligna. Este líquido está constituido por una gran cantidad de factores proteicos que son capaces de inducir diversos procesos como proliferación, invasión y metástasis. El comportamiento metastásico del cáncer está influenciado por el microambiente en el que reside, por lo tanto, es necesario el estudio de las moléculas que participan en este proceso y que favorecen la inducción de un fenotipo celular más agresivo de las células transformadas. Por lo que, el estudio de los componentes presentes en el líquido ascítico que participan en el desarrollo tumoral permitirá el diseño de esquemas terapéuticos para una de las principales causas de mortalidad a nivel nacional.

V. HIPÓTESIS

El líquido ascítico y/o algunos de sus componentes como la haptoglobina, inducen la expresión del receptor de quimiocinas CCR2 y favorecen la migración celular.

VI. OBJETIVOS

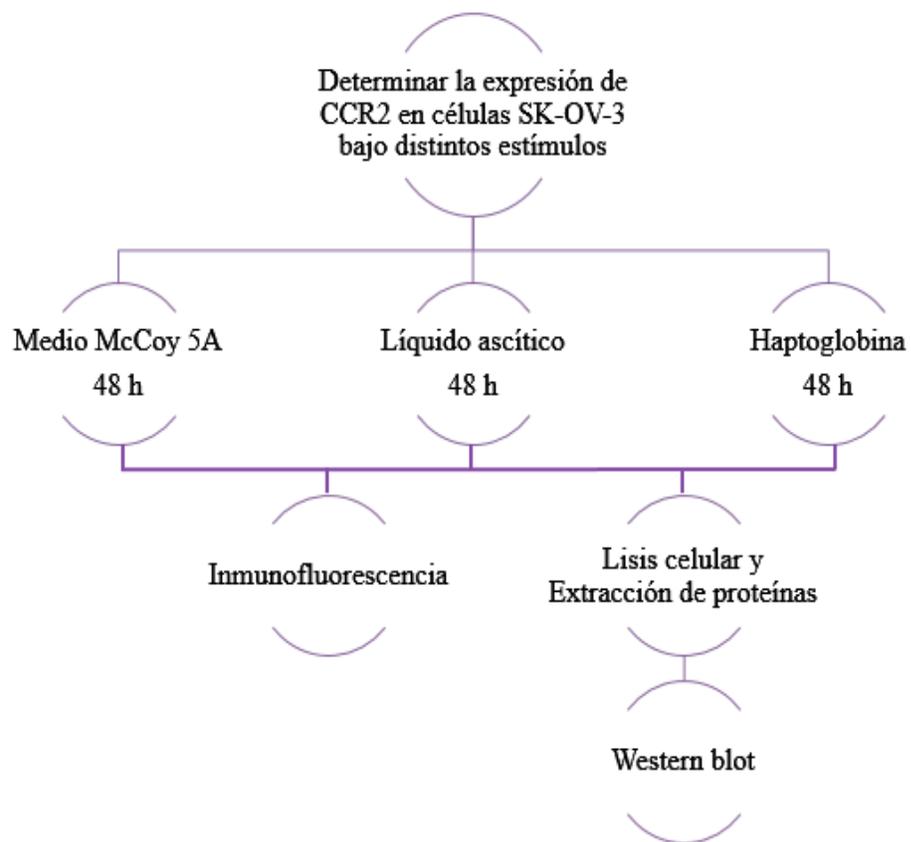
Objetivo general

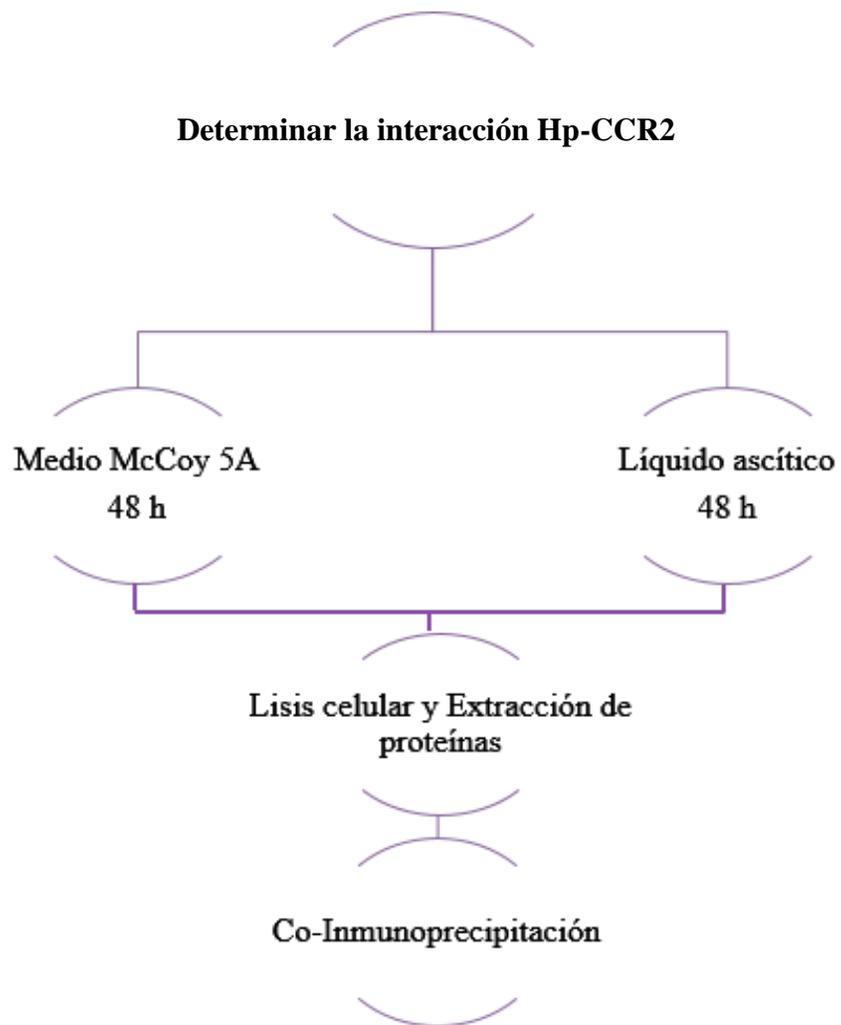
Estudiar la inducción del receptor de quimiocinas CCR2 *in vitro*, mediante el uso de una línea celular de adenoma ovárico SK-OV-3, así como su posible participación en el proceso de migración.

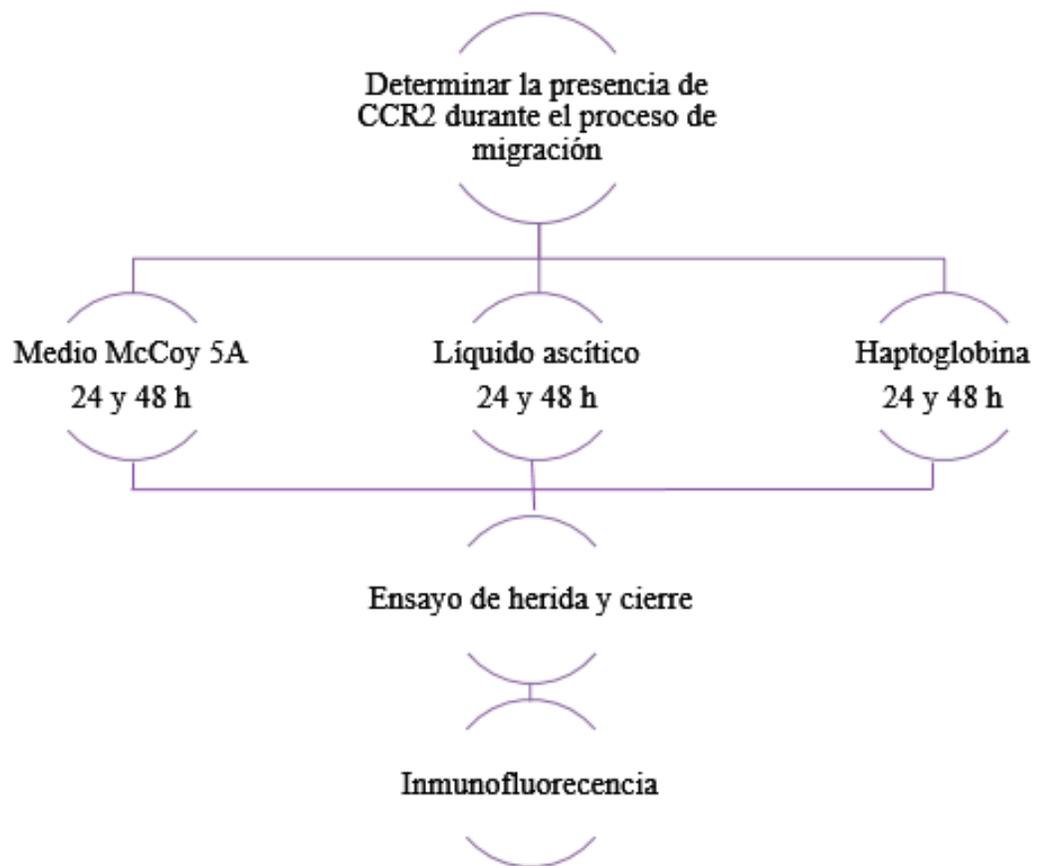
Objetivos particulares

- Determinar la expresión de CCR2 en células SK-OV-3 bajo distintos estímulos: Medio de cultivo, líquido ascítico, Haptoglobina
- Determinar la interacción entre Haptoglobina y el receptor CCR2
- Determinar la presencia de CCR2 durante el proceso de migración

VII. ESTRATEGIA METODOLÓGICA







VIII. METODOLOGÍA

❖ **Tratamientos de células SK-OV-3**

Se colocaron 400,000 células SK-OV-3 en frascos de cultivo T-25 y tras 24 h de adaptación fueron lavadas con PBS 1x antes de ser expuestas por 48 h a 3 condiciones de estimulación: 12 ml de medio de cultivo fresco McCoy 5A sin SFB como control negativo, 12 ml de líquido ascítico (nos referiremos a éste como LA y con él se realizaron la mayoría de los ensayos; dicho líquido corresponde a la paciente con el No. Exp. 152433D) como control positivo y 12 ml de medio sin SFB conteniendo 250 µg de proteína Haptoglobina (No. Cat. ab77872) como condición experimental. Se incubaron las células durante el tiempo mencionado a 37 °C y 5% de CO₂, una vez transcurrido el tiempo de estimulación se procedió a realizar la lisis celular.

También se colocaron aproximadamente 30,000 células SK-OV-3 en cubreobjetos y tras 24 h de adaptación, se colocaron durante 48 h bajo las 3 condiciones de estímulo anteriormente mencionadas en un volumen de 2 ml siguiendo el protocolo anteriormente mencionado; una vez transcurrido el tiempo de estimulación se realizaron ensayos de inmunofluorescencia.

❖ **Esquema de lisis celular**

Se recuperaron las células de los frascos de cultivo T-25, retirando el medio de cultivo y lavando 5 veces con 10 ml de PBS 1x, posteriormente se retiró el PBS y se agregó 1 ml de amortiguador de lisis (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM y Nonidet P-40 al 1%) con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Aprotinina 1 µg/ml, Leupeptina 1 µg/ml, PMSF 1 mM, Na₃VO₄ 10 µM y NaF 100 mM). Se sometieron a un raspado mecánico con ayuda de un “scraper”, se dejaron reposar por 30 min en hielo para propiciar la interacción con el amortiguador de lisis y finalmente se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min a 4 °C, se colectó el sobrenadante y se realizó la cuantificación proteica mediante Micro-Lowry.

❖ **Electroforesis 1D**

Los extractos de las células SK-OV-3 expuestas a las diferentes condiciones se corrieron en geles de poliacrilamida al 12.5% para conocer su perfil proteico. Las muestras se prepararon en condiciones desnaturalizantes con el amortiguador de muestra. Dichas muestras se corrieron en minigeles en a 90 volts por aproximadamente 95 min. Como marcador de peso molecular se utilizó Precision Plus Protein® Dual Color, Bio Rad (Cat. No. 161-0374). Un gel se utilizó para realizar la tinción con plata y analizar el perfil proteico. Una réplica de dicho gel se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa para su análisis por western blot.

❖ **Western Blot**

Para este ensayo se realizó inicialmente una electrotransferencia a partir del gel SDS-PAGE al 12.5%. La electrotransferencia se realizó en presencia de amortiguador de transferencia frío y se dejó transfiriendo toda la noche a 20 V y 4 °C. Se recuperó la membrana de nitrocelulosa con las proteínas transferidas y se tiñó con el colorante Rojo de Ponceau por 30 min en agitación constante a temperatura ambiente. Se lavó la membrana con TBS-Tween 20 al 0.05% hasta lograr quitar la mayor cantidad de colorante. Se bloqueó la membrana con leche al 5% en TBS-Tween por 1 h. Se lavó la membrana con TBS-Tween (4-5 lavados 20 min c/u). para la detección de CCR2 se adicionó el anticuerpo primario CKR-2B (No. Cat. sc-74491) (Dil 1:500) en TBS-Tween leche al 3%, se dejó incubando toda la noche. Se lavó exhaustivamente con TBS-Tween 0.05% (5-7 lavados de 15 min c/u). Se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (Dil. 1:10,000) en TBS-Tween leche al 3% por 1 h a temperatura ambiente y en agitación constante. Se lavó 3 a 5 veces con TBS-Tween 15 min c/lavado. Se reveló por quimioluminiscencia. Este mismo protocolo se llevó a cabo para la detección de Haptoglobina con el anticuerpo primario 26E11(No. Cat. sc-69782) (Dil 1:5000).

❖ **Stripping**

Para eliminar los anticuerpos utilizados en una primera reacción de western blot y así poder reusar la membrana, se realizó el procedimiento conocido como “Stripping”. Para ello, se incubó la membrana en buffer de Stripping (SDS 2%, β-mercaptoetanol 100 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 6.8) durante 30 min a 50 °C en agitación continua, se colocó la membrana en TBS-T y se agitó por 10 min; enseguida se realizó el protocolo de detección omitiendo el anticuerpo primario para asegurar que el anticuerpo previo había sido eliminado de la membrana, finalmente se colocó la membrana en PBS en agitación por 10 min y quedó lista para un segundo proceso de detección.

❖ **Inmunofluorescencia**

Las células SK-OV-3 sometidas a diferentes condiciones (LA, Hp o medio de cultivo) se fijaron con p-formaldehído al 4% por 1 h a 37 °C. Se lavaron 3 veces con PBS 1x filtrado y se permeabilizaron con una solución de 0.02% de Tritón X-100 en PBS 1x por 15 min a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces con PBS 1x filtrado y se bloquearon con SFB al 10% por 1 h a 37 °C. Se adicionó el anticuerpo correspondiente (CKR-2B para marcar CCR2 o 26E11 para marcar Hp) en una dilución 1:50 en PBS 1x, se incubó toda la noche a 4 °C en agitación constante. Al siguiente día se lavaron tres veces con PBS 1x. Se colocó el Ab secundario anti IgG-ratón-FITC y se incubó durante 1 h a 37 °C en cámara húmeda. Se agregó el Vecta-shield que contiene DAPI y se montó en un portaobjetos. Se guardó a 4°C con protección de luz, hasta su observación en el microscopio confocal Zeiss LSM 700.

❖ **Co-Immunoprecipitación**

Partiendo de 1 mg de extractos proteicos de células SK-OV-3 bajo estimulación con LA y medio de cultivo se llevó a cabo el proceso de preaclerado con proteína G agarosa a 4 °C durante el transcurso de la noche en agitación continua. La muestra se decantó, las perlas se lavaron y almacenaron para su posterior uso a -20 °C, el sobrenadante obtenido se incubó con el anticuerpo CKR-2B (Dil. 1:50) a 4 °C durante la noche en agitación continua. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se añadió a la muestra proteína G agarosa previamente bloqueada con BSA al 0.5%, se incubó nuevamente a 4 °C durante el transcurso de la noche en agitación continua. Transcurrida la noche la muestra se dejó sedimentar en hielo, se desechó el sobrenadante y se adicionó buffer de muestra para colocar la muestra en geles de poliacrilamida al 15% y realizar la electroforesis 1D; un gel se utilizó para realizar la tinción con azul de Coomassie y analizar el perfil proteico, y una réplica de dicho gel se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa para inmunodetección de CCR2 y Hp en el complejo precipitado.

❖ **Overlay**

Los extractos de células SK-OV-3 estimuladas con LA, medio de cultivo, así como, extractos de macrófagos y la proteína Hp (5 µg) se sometieron a electroforesis unidimensional en gel de poliacrilamida al 15 % y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa. Se bloqueó la membrana con leche al 5% en TBS-Tween por 1 h a temperatura ambiente, se realizaron lavados con TBS-Tween (4-5 lavados, 20 min c/u), la membrana se incubó con 100 µg de Hp durante 24 h a 4 °C para permitir la interacción de la misma con el receptor expresado, una vez concluida la incubación se realizaron 4 lavados con TBS-T (20 min). Posteriormente se incubó con anticuerpo primario anti-Hp (Dil. 1:5000) durante 24 h a 4 °C en agitación continua y finalmente con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (Dil. 1:10,000) en TBS-Tween leche al 3% por 1 h a temperatura ambiente y en agitación constante. Se lavó 3 a 5 veces con TBS-Tween 15 min c/lavado. Se reveló por quimioluminiscencia.

❖ **Ensayos de herida y cierre**

Las células SK-OV-3 crecidas en cubreobjetos se pre trataron con Mitomicina C (0.02 mg/ml) durante 2 h para inhibir la proliferación celular que pudiera interferir con la migración celular. Posteriormente se realizaron las heridas con una punta de pipeta de 200 µl, se realizaron lavados con 1 ml de PBS 1x para remover los remanentes de mitomicina y las células se incubaron durante 48 h con las distintas condiciones: LA, Hp (250 µg) y medio de cultivo. Se llevó a cabo el monitoreo a 24 y 48 h para observar su comportamiento migratorio, fijando a las células con p-formaldehído al 4% durante 1 h, se permeabilizaron con Triton X-100 0.2% y se bloquearon con BSA al 10%, se incubaron con el anticuerpo primario CKR-2B (Dil. 1:50) durante 24 h, y finalmente con el anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a FITC (Dil. 1:100), las muestras se montaron en Vecta-shield y se observaron mediante microscopía confocal.

IX. RESULTADOS

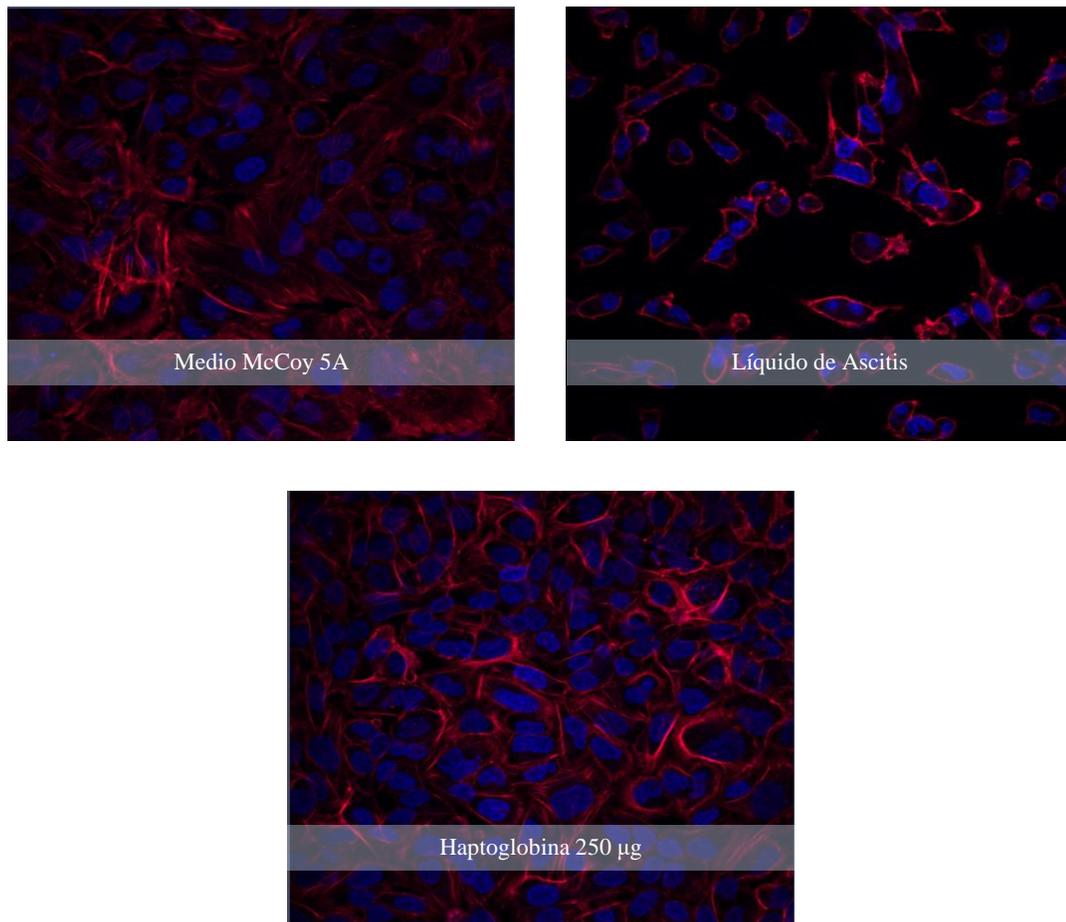
Tratamiento de células SK-OV-3 con Haptoglobina

Los cambios morfológicos de las células SK-OV-3 tratadas con la proteína Haptoglobina (Hp) se analizaron por microscopía de luz tras 24 y 48 horas de estimulación (Fig. 3 panel A y B respectivamente). Como se observa en la Figura 3, las células SK-OV-3 poseen un fenotipo epitelial en la condición de medio de cultivo el cual se modifica hacia un fenotipo migratorio en presencia de líquido ascítico, efecto que se acentúa durante el transcurso del tiempo; en cuanto a las células expuestas a Hp, estas muestran un discreto cambio morfológico sobretodo en la concentración más alta, pero sin llegar al grado mostrado por efecto del líquido ascítico.



Figura. 3 Cambio morfológico inducido en células SK-OV-3. Microscopía óptica (objetivo 10x). Las células SK-OV-3 muestran una morfología característica cuando se mantienen en medio de cultivo la cual se modifica hacia una forma fusiforme con abundantes prolongaciones cuando se colocan bajo el estímulo con LA. Un efecto similar, pero de menor intensidad se observa con Hp.

Con el fin de analizar el efecto de los diferentes tratamientos sobre el citoesqueleto de actina, una vez realizada la estimulación las células se procesaron para su observación mediante microscopía confocal, tiñiendo con Faloidina-rodamina al citoesqueleto de actina y con DAPI los núcleos celulares. Se aprecia que las células SK-OV-3 bajo la condición de LA muestran una activa polimerización de actina con formación de estructuras similares a filopodios comparado con la condición control. En el caso de las células estimuladas con Hp, se observa la formación de fibras de estrés (Fig. 4).



- DAPI: Núcleo
- Faloidina-Rodamina: Actina

Figura. 4 Inducción de rearrreglo de citoesqueleto de actina en células SK-OV-3 Aumento 60x. Tinción del citoesqueleto de actina que muestra la formación de prolongaciones similares a filopodios bajo el estímulo con LA, así como la formación de fibras de estrés cuando se estimula con Hp. Estos cambios morfológicos son importantes en los procesos de invasión y migración de células neoplásicas.

Inducción de la expresión del receptor de quimiocinas CCR2 en la línea celular SKOV3.

Con el fin de evaluar la capacidad inductora de la Hp referente al receptor CCR2, se utilizaron los extractos celulares de SK-OV-3 previamente tratadas con 250 µg de Hp como condición experimental, LA como control positivo y Medio McCoy 5A como control negativo, para su análisis mediante Electroforesis unidimensional y Western blot. El perfil proteico, analizado mediante la tinción con plata, no mostró diferencias importantes entre las condiciones estudiadas (Fig. 5 panel A). El ensayo de Western blot reveló la inducción de CCR2 por parte del LA y una total ausencia en las demás condiciones (Fig. 5 panel B, carril 3). Con base en la secuencia aminoacídica de CCR2, éste posee un peso molecular predicho de 41 kDa y este ensayo muestra señal a nivel de aproximadamente 50 kDa, por lo que se realizaron las réplicas correspondientes para corroborar los datos obtenidos.

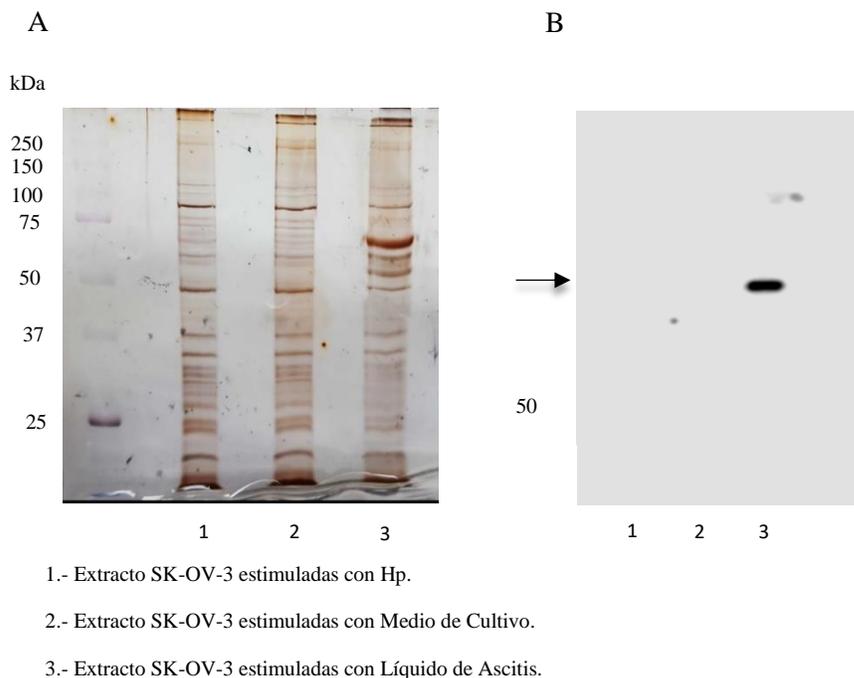


Figura. 5 Expresión de CCR2 en células SK-OV-3. Para detectar la inducción de CCR2, se realizaron ensayos de SDS-PAGE y Western blot de células SK-OV-3 bajo distintos estímulos, utilizando el mAbCKR-2B (dil 1:500) como anticuerpo primario y un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a HRP (dil 1: 10,000) como anticuerpo secundario.

El receptor de quimiocinas CCR2 se localiza en la membrana plasmática y citoplasma de células SK-OV-3

Con el fin de conocer la distribución subcelular del CCR2, cultivos de células SK-OV-3 crecidas en cubreobjetos se incubaron con el mAbCKR-2B de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Las laminillas se observaron por microscopía confocal. Como control negativo de fluorescencia una de las laminillas se incubó únicamente con el anticuerpo secundario α -ratón-FITC y no se observó señal alguna, descartando así que la señal observada en las muestras problema pudiera deberse a un reconocimiento inespecífico del anticuerpo secundario. Las condiciones probadas fueron células SK-OV-3 crecidas en Medio McCoy 5A, LA y Medio McCoy conteniendo 250 μ g/ml de Hp. La señal positiva que indica la presencia del receptor se detectó únicamente en la condición de SK-OV-3 en LA; dicha señal se localizó tanto en el citoplasma como en la membrana celular (Fig. 6).

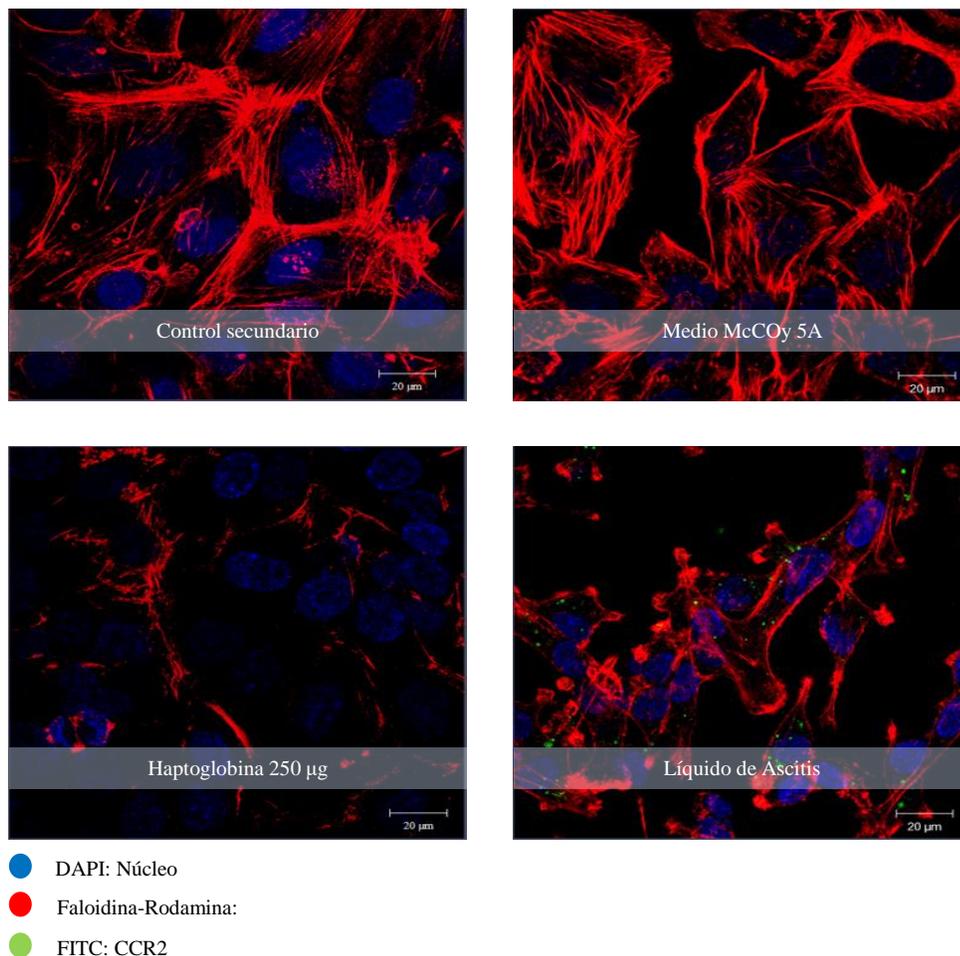


Figura. 6 Distribución subcelular de CCR2 en células SK-OV-3. Para determinar la localización subcelular de CCR2, se realizaron ensayos de Inmunofluorescencia de células SK-OV-3 bajo distintos estímulos, utilizando el mAbCKR-2B (dil 1:500) como anticuerpo primario y un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a FITC (dil 1:100) como anticuerpo secundario. Las muestras se analizaron por microscopía confocal.

Se realizó una réplica de este ensayo aumentando la concentración de Hp en los cultivos, de 250 μg a 500 μg , y añadiendo una condición control de estimulación positiva, la proteína quimioattractante de macrófagos 1 (MCP-1 / CCL2). Se observa una discreta marca positiva con la nueva concentración de Hp y resultados similares al ensayo anterior tanto en la condición de medio de cultivo como de LA (Fig.7). Para el caso de los cultivos crecidos con Hp (Fig. 8) y MCP-1 (Fig. 9) se realizó una exploración utilizando la herramienta “tile scan” de 2 x 2 observando un escaso número de células positivas que expresan CCR2.

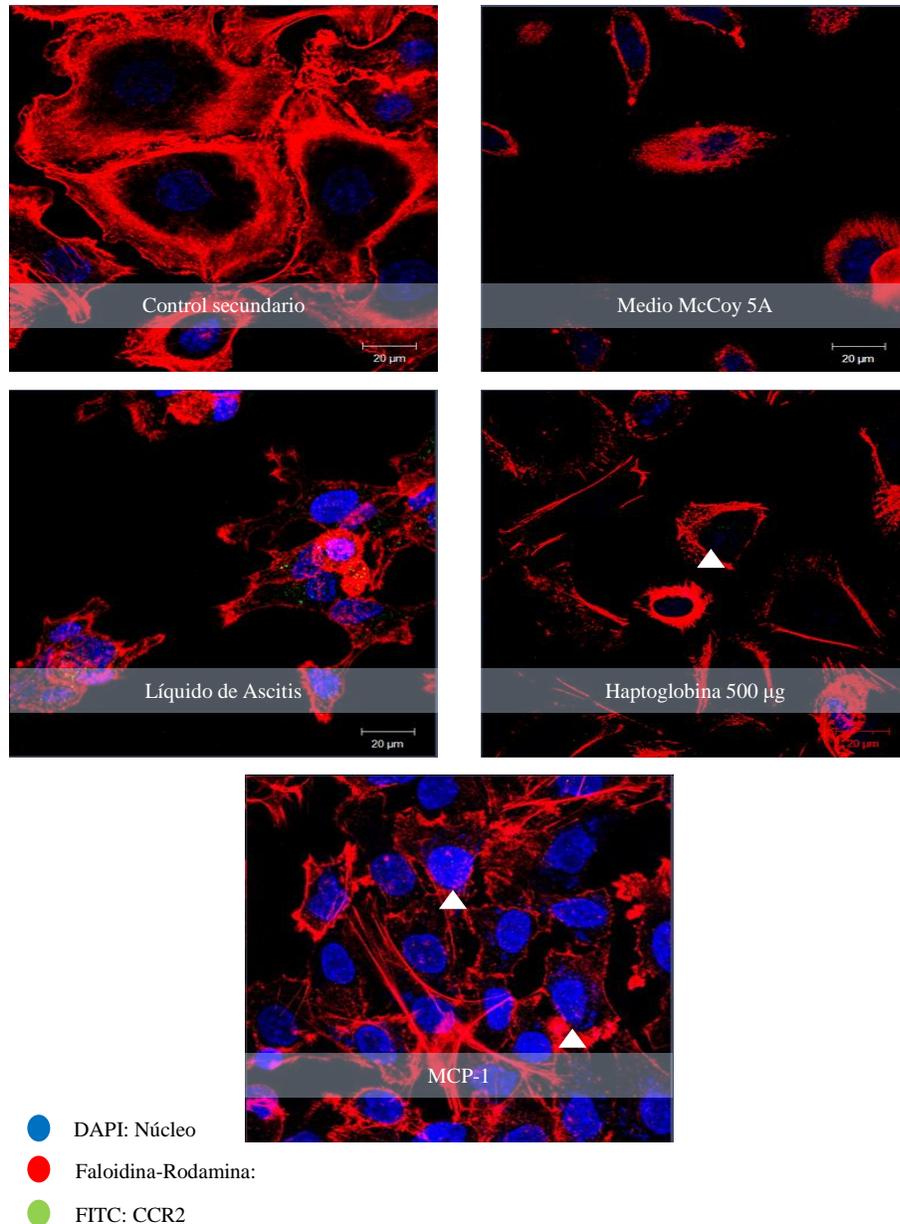
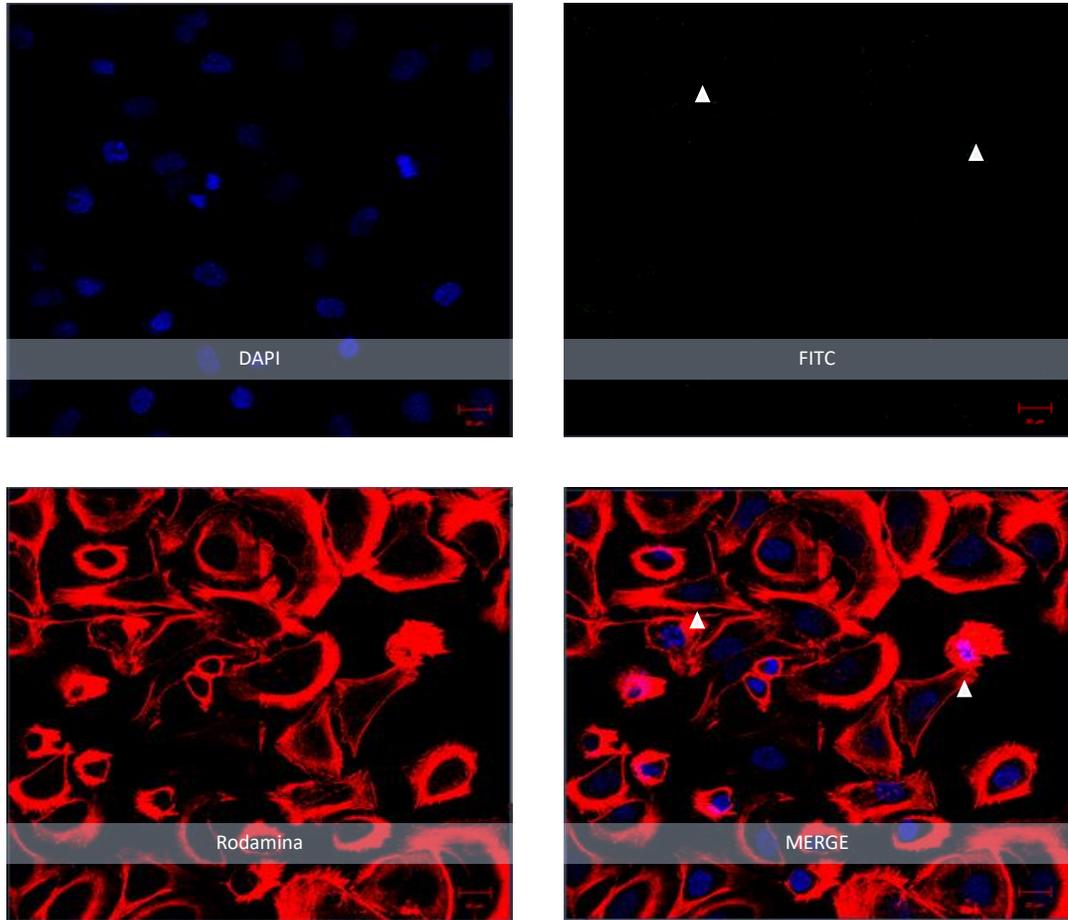
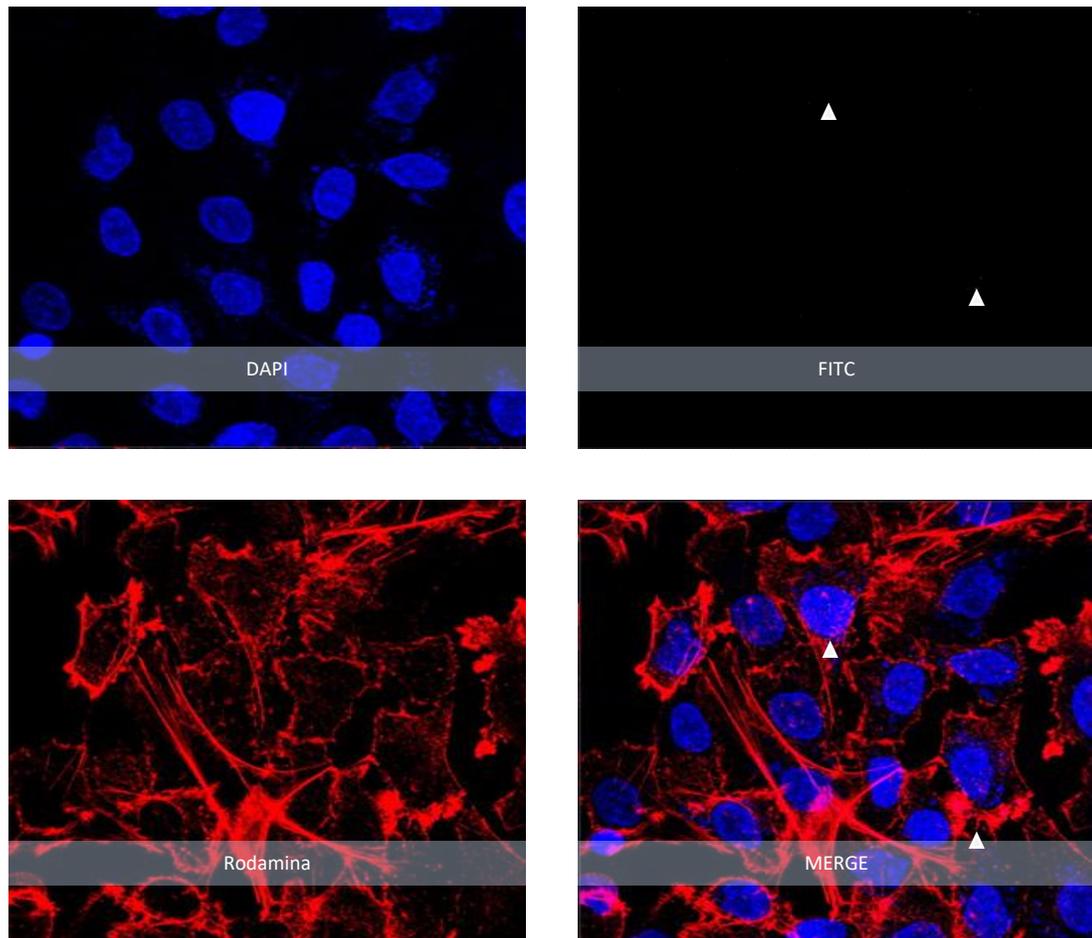


Figura. 7 *Expresión y distribución subcelular de CCR2 en SK-OV-3. Aumento 60x. Se observa una discreta marca fluorescente en las células tratadas con 500 μg de Hp y en las tratadas con MCP-1, se señala con flechas blancas aquellas células positivas para CCR2. Las condiciones de incubación con los anticuerpos fueron similares a las que se describen en la figura 6.*



- DAPI: Núcleo
- Faloidina-Rodamina:
- FITC: CCR2

Figura. 8 Tile scan de inmunofluorescencia en células SK-OV-3 tratadas con 500 μg de Hp. Se realizó un “Tile Scan 3 x 3” en búsqueda de células positivas las cuales se señalan con una flecha. Las condiciones de incubación con los anticuerpos fueron similares a las que se describen en la figura 6.

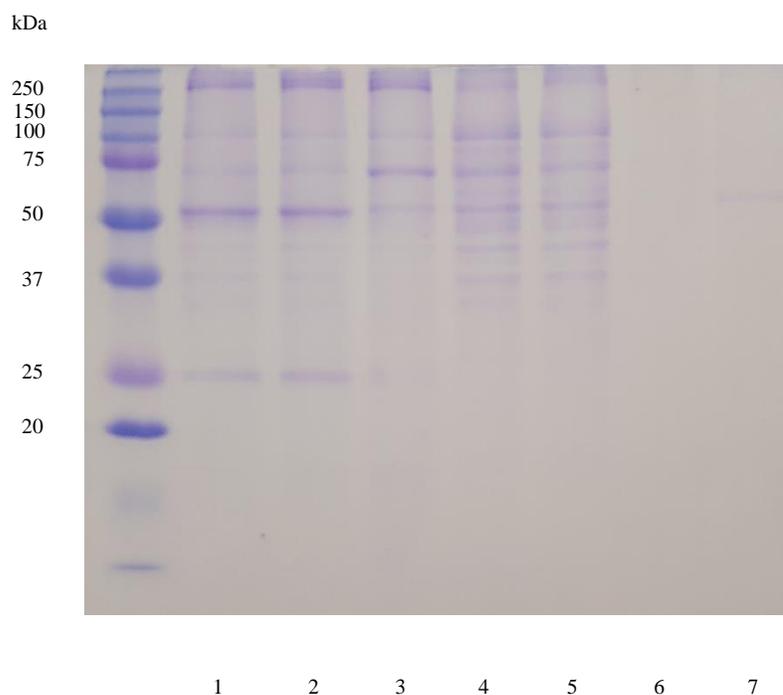


- DAPI: Núcleo
- Faloidina-Rodamina:
- FITC: CCR2

Fig. 9 Tile scan de inmunofluorescencia en células SK-OV-3 tratadas con MCP-1. Se realizó un "Tile Scan 3 x 3" Las flechas señalan células positivas para CCR2 tras 48 horas de estimulación con 100 ng de MCP-1. Las condiciones de incubación con los anticuerpos fueron similares a las que se describen en la figura 6.

Interacción Haptoglobina - CCR2 en células SK-OV-3

Para analizar la interacción entre las proteínas Hp y CCR2, a partir de un lisado celular, se realizó el ensayo de Co-Imunoprecipitación, donde el antígeno precipitado por el mAbCKR-2B “co-precipita” con la(s) proteína(s) unida(s) a éste. Los lisados celulares utilizados fueron los obtenidos de células SK-OV-3 estimuladas durante 48 horas con LA dado su alto contenido de Hp, y los lisados de células estimuladas con Medio McCoy 5A como control. Como control de especificidad del ensayo, se utilizó un anticuerpo no relacionado (Mouse inmunoglobulin G). Una vez obtenidos los extractos y precipitados, se realizó electroforesis en una dimensión para el análisis del patrón proteico mediante la tinción con azul de Coomassie. La figura 10 muestra patrones proteicos diferenciales entre las condiciones precipitadas con el anticuerpo anti-CCR2 y la condición precipitada con el anticuerpo no relacionado, lo que sugiere que se trata de un material específico (Fig. 10).

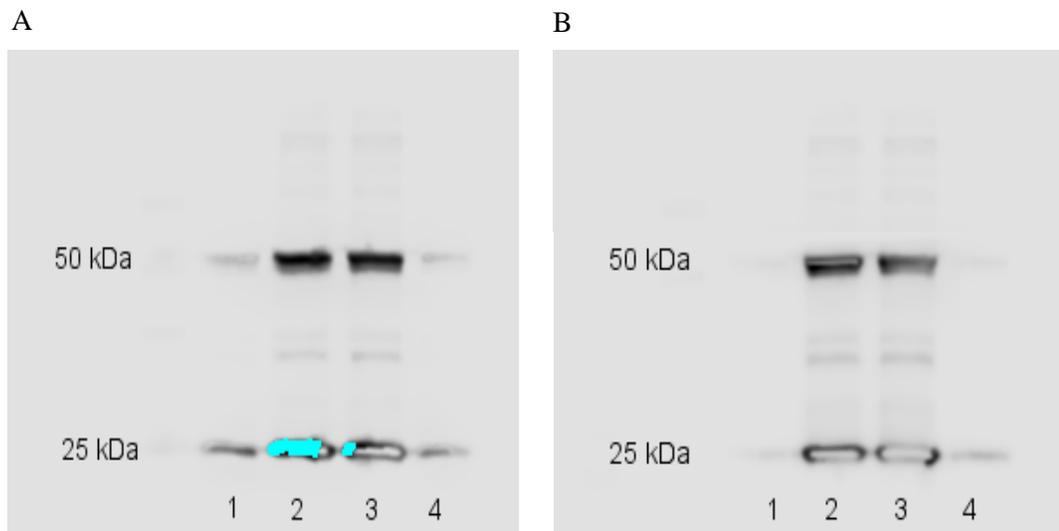


- 1.- Precipitado condición Medio de Cultivo (anti-CCR2)
- 2.- Precipitado condición Líquido de Ascitis (anti-CCR2)
- 3.- Precipitado condición Líquido de Ascitis + anticuerpo no relacionado
- 4.- Extracto proteico total de SK-OV-3 en medio de cultivo
- 5.- Extracto proteico total de SK-OV-3 en Líquido de Ascitis
- 6.- Perlas de preclarado condición Medio de Cultivo
- 7.- Perlas de preclarado condición Líquido de Ascitis

Figura. 10 Ensayo de Co-IP analizado por SDS-PAGE al 15%. Carriles 1 y 2, material precipitado por el anticuerpo anti-CCR2 (dil 1:50); carriles 3 y 4, material precipitado por el anticuerpo no relacionado (dil 1:500). Carriles 4 y 5, extractos proteicos de SK-OV-3. Los carriles 6 y 7 muestran el procesamiento de las perlas de preclarado para cada condición. Los carriles 1, 4 y 6 corresponden a la condición de medio de cultivo; los carriles 2, 3, 5 y 7 a la condición de líquido ascítico

Muestras equivalentes se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para analizar la presencia de CCR2 por Western blot. En el carril 1, se colocó el extracto total de células SK-OV-3 estimuladas con LA como un control positivo ya que, como se ha mostrado en resultados previos, el LA favorece la expresión del receptor CCR2 por estas células. Sin embargo, como se observa en la Fig. 11, hay señal positiva en todos los carriles a nivel de 50 y 25 kDa, lo que podría corresponder a las cadenas pesadas y ligeras de las inmoglobulinas respectivamente, sin embargo, la mayor intensidad observada en los carriles 2 y 3 sugiere que efectivamente se realizó la precipitación del receptor que posee también un peso molecular de 50 kDa.

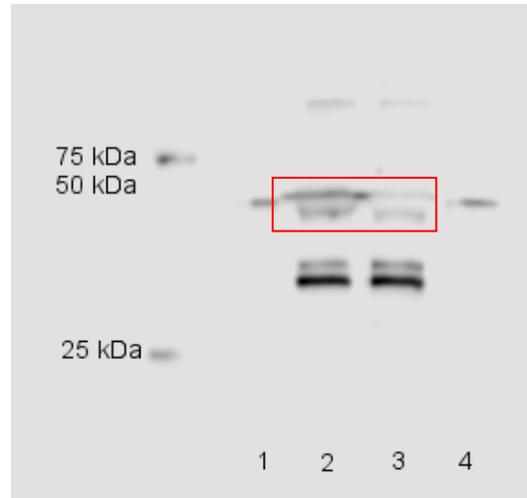
En el panel B se coloca a la membrana incubada únicamente con el anticuerpo secundario α -ratón-HRP, utilizada como control de anticuerpo secundario para corroborar que se trata de un reconocimiento específico por ambos anticuerpos tanto el primario como el secundario, observando nuevamente señal de menor intensidad a nivel de 50 y 25 kDa principalmente en los carriles 2 y 3, esto debido a la presencia de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas como se mencionó anteriormente.



- 1.- Extracto proteico total SK-OV-3 en condición de Líquido de Ascitis
- 2.- Precipitado condición Medio de Cultivo (anti-CCR2)
- 3.- Precipitado condición Líquido de Ascitis (anti-CCR2)
- 4.- Precipitado condición Líquido de Ascitis + anticuerpo no relacionado

Figura. 11 Western blot con el mAbCKR-2B en el ensayo de Co-IP. En el panel A se muestra la membrana incubada con los anticuerpos primario (mAbCKR-2B dil. 1:500) y secundario (α -ratón-HRP dil. 1:10,000). En el panel B se muestra la membrana incubada únicamente con el anticuerpo secundario (α -ratón-HRP dil. 1:10,000) utilizada como control de especificidad.

Una vez visualizado CCR2, se realizó el proceso de stripping, como se menciona en la sección de métodos, a una de las membranas anteriormente mostradas para ser incubada ahora con el mAb26E11 anti-Hp para confirmar si la proteína Hp se encontraba presente en el complejo precipitado. Mediante Western blot se obtuvo un doblete de aproximadamente 48 kDa (Fig. 12, carriles 2 y 3) que sugiere la presencia de la cadena β de la Hp. Sin embargo, no se esperaba esta señal en el precipitado de extractos de células SK-OV-3 estimulados con medio de cultivo ya que no se había reportado la presencia de esta proteína de forma constitutiva la línea celular utilizada.



- 1.- Extracto proteico total SK-OV-3 en condición de Líquido de Ascitis
- 2.- Precipitado condición Medio de Cultivo (anti-CCR2)
- 3.- Precipitado condición Líquido de Ascitis (anti-CCR2)
- 4.- Precipitado condición Líquido de Ascitis + anticuerpo no relacionado

Fig. 12 Western blot anti-Hp ensayo Co-IP. (mAb26E11 dil. 1:5000) La membrana de nitrocelulosa previamente utilizada para analizar la presencia de CCR2, se sometió al proceso de stripping para enseguida realizar el ensayo de western blot para la identificación de la Hp. La membrana se incubó con el anticuerpo primario anti-Hp (dil 1:5000) y con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a HRP (dil 1:10,000). En el carril 1 se colocó el extracto total de SK-OV-3 como un control positivo.

Ya que la Hp se encuentra presente de forma constitutiva en las células SK-OV-3 y aparentemente interactúa con algún componente del complejo precipitado, se decidió realizar un ensayo de overlay, importante para la validación de la interacción entre las proteínas CCR2 y Hp.

Para dicho ensayo se utilizaron los extractos de células SK-OV-3 estimuladas con LA para asegurar la expresión de CCR2 y como condición experimental, los extractos de células SK-OV-3 en medio de cultivo como un control negativo, extractos de macrófagos como un control positivo por ser células que expresan de forma constitutiva este receptor y la proteína Hp como un control de detección por el mAb26E11. La figura 13 muestra señal positiva en el carril 3 que corresponde a la condición de células SK-OV-3 tratadas con líquido ascítico; mientras que en el carril 2 se observa el patrón correspondiente al habitual detectado por el anticuerpo anti-Hp; no se observa señal en el carril 4 lo que concuerda con su función de control negativo. Sin embargo, en los carriles 1 y 3, donde se esperaba señal a nivel de 50 kDa, de haber ocurrido la interacción de la Hp con el receptor CCR2 presente tanto en macrófagos como en células SK-OV-3 estimuladas, no se observó ninguna señal.

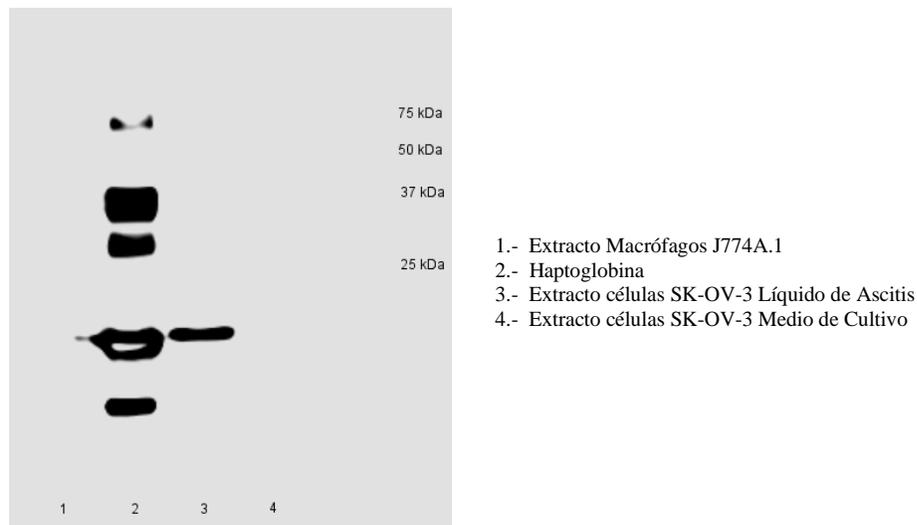


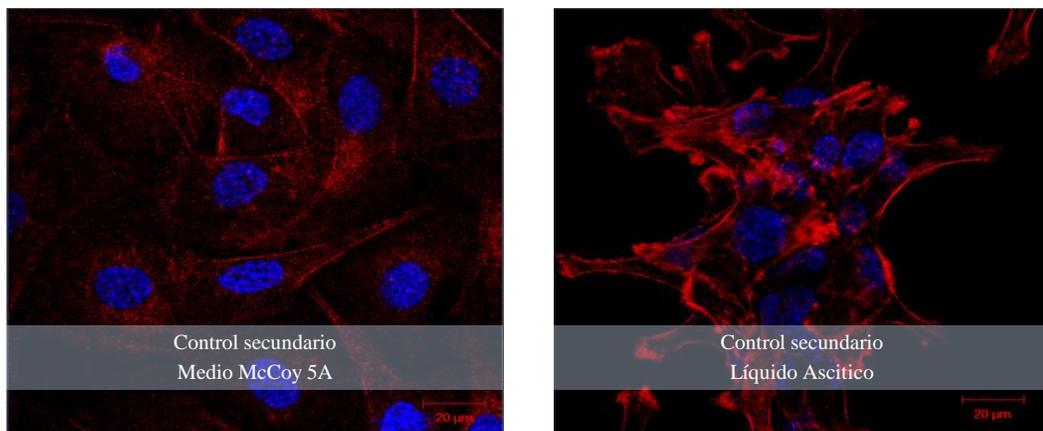
Figura 13 Ensayo de Overlay para el estudio de la interacción CCR2-Hp. La membrana se incubó con 100 µg de Hp para permitir la interacción, para la inmunodetección se usó el anticuerpo primario anti-Hp (dil 1:5000) y el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a HRP (dil 1: 10,000).

Este ensayo corrobora los resultados obtenidos en la Co-inmunoprecipitación donde efectivamente las células SK-OV-3 son susceptibles para la inducción de la expresión de CCR2 y que además expresan de forma constitutiva a la Hp, la cual posiblemente interactúa con alguna proteína presente en el complejo precipitado, pero no directamente con el receptor de quimiocinas CCR2.

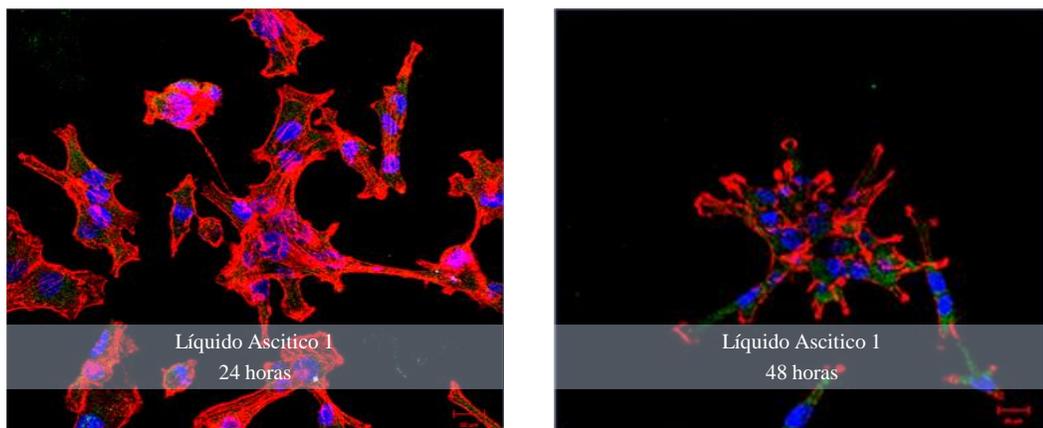
Estimulación de la expresión de Hp en células SK-OV-3

Dado que el ensayo de Co-inmunoprecipitación muestra la presencia de Hp tanto en células SK-OV-3 mantenidas en medio de cultivo sin estimulación como en estimulación con LA, se decidió determinar la expresión de esta proteína a través de ensayos de Inmunofluorescencia y Western blot en ambas condiciones durante 24 y 48 horas. Se utilizaron 2 líquidos de ascitis diferentes para apreciar si la expresión de esta proteína varía dependiendo del líquido ascítico utilizado. Transcurrido los tiempos de incubación, las células se procesaron como se describe en métodos, con el anticuerpo mAb26E1. Como control de fluorescencia se utilizaron 2 laminillas de células SK-OV-3 mantenidas en ambas condiciones, incubadas únicamente con anticuerpo secundario α -ratón-FITC (fig. 14 Panel A). La Hp es una proteína expresada de forma constitutiva como puede observarse en las células mantenidas en medio McCoy 5A (fig. 14 Panel D), sin embargo, esta expresión se ve aumentada de forma tiempo dependiente cuando las células son estimuladas con LA y la intensidad de expresión varía con cada uno de los distintos LA (fig.14 Panel B, C).

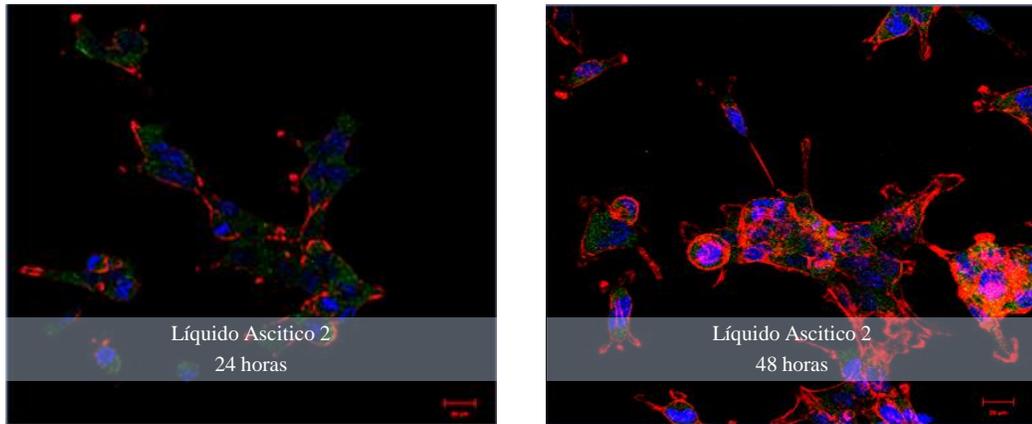
A



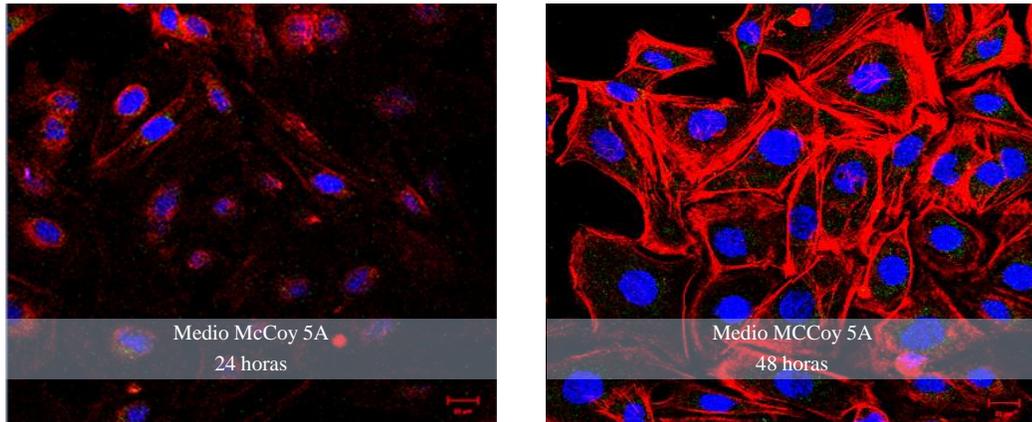
B



C



D



- DAPI: Núcleo
- Faloidina-Rodamina:
- FITC: Hp

Figura 14 Inducción de la expresión de Hp en células SK-OV-3 por el tratamiento con diferentes líquidos ascíticos. Aumento 60x. Tinción con el anticuerpo monoclonal 26E1 (Dil 1:50) y revelado con α -ratón-FITC (Dil 1:100). En los paneles B, C y D se muestra la proyección máxima (3D) que evidencia la expresión de la proteína Hp constitutivamente por las células SK-OV-3; esta expresión aumenta bajo el estímulo del LA de forma tiempo dependiente.

Los niveles de expresión de la Hp se verificaron mediante ensayos de Western blot. los extractos de células SK-OV-3 incubadas durante 48 horas con Medio McCoy 5A, así como una alícuota de la proteína Hp se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, la cual se incubó con el mAb26E1 y se reveló mediante quimioluminiscencia. En la figura 15, en el carril 1 se colocó a la proteína Hp (3 µg) y se observa el patrón habitual de bandas, una de ellas aproximadamente a nivel de 48 kDa que corresponde a la cadena β, y a nivel de 18 kDa que corresponde a las cadenas α₁ y α₂. En el carril 2 se colocó el extracto de células SK-OV-3 en Medio McCoy 5A y se observa una intensa señal a nivel de 50 kDa, 28 kDa y 20 kDa que podrían corresponder a las cadenas β, α₁ y α₂. Este resultado apoya que las células SK-OV-3 expresan de forma constitutiva a la proteína Hp.

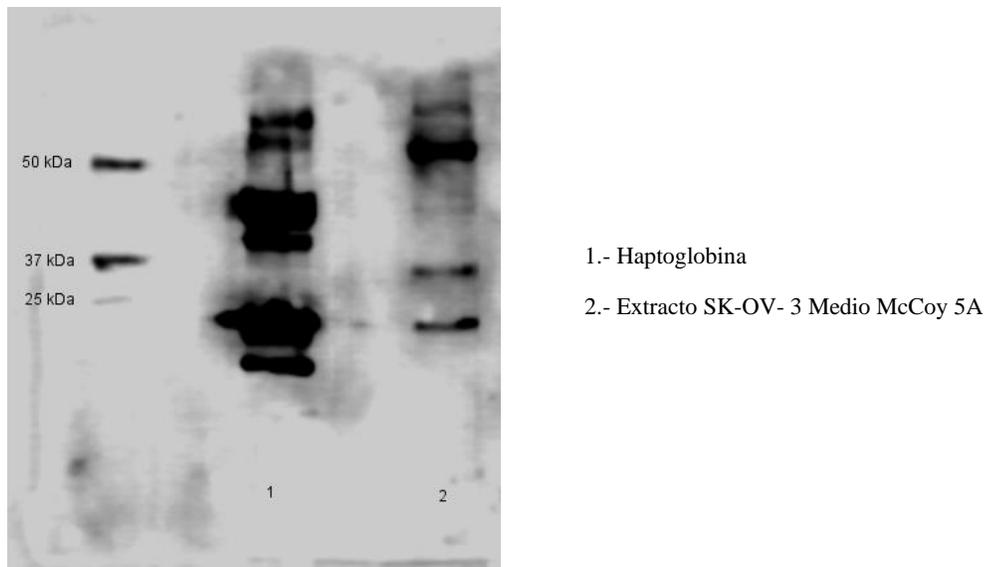


Fig. 15 Western blot mAb26E1. (dil 1:5000) Las células SK-OV-3, conservan la propiedad del tejido ovárico sano de producir Hp.

Presencia de CCR2 durante el proceso de migración en células SK-OV-3

CCR2 es un receptor que se ha asociado a migración celular, para determinar la presencia de este receptor durante el proceso de migración de las células SK-OV-3 se realizó un ensayo de herida y cierre. En la figura 16 panel A, se muestra a las células SK-OV-3 en medio de cultivo fijadas a tiempo 0 para referenciar tanto el tamaño de la herida utilizada, así como la ausencia del receptor en las células sin estimulación. En los paneles B y C se muestran células SK-OV-3 en medio de cultivo durante 24 y 48 h respectivamente, en ambos casos la herida se mantiene abierta no hay indicios de migración, ni presencia del receptor.

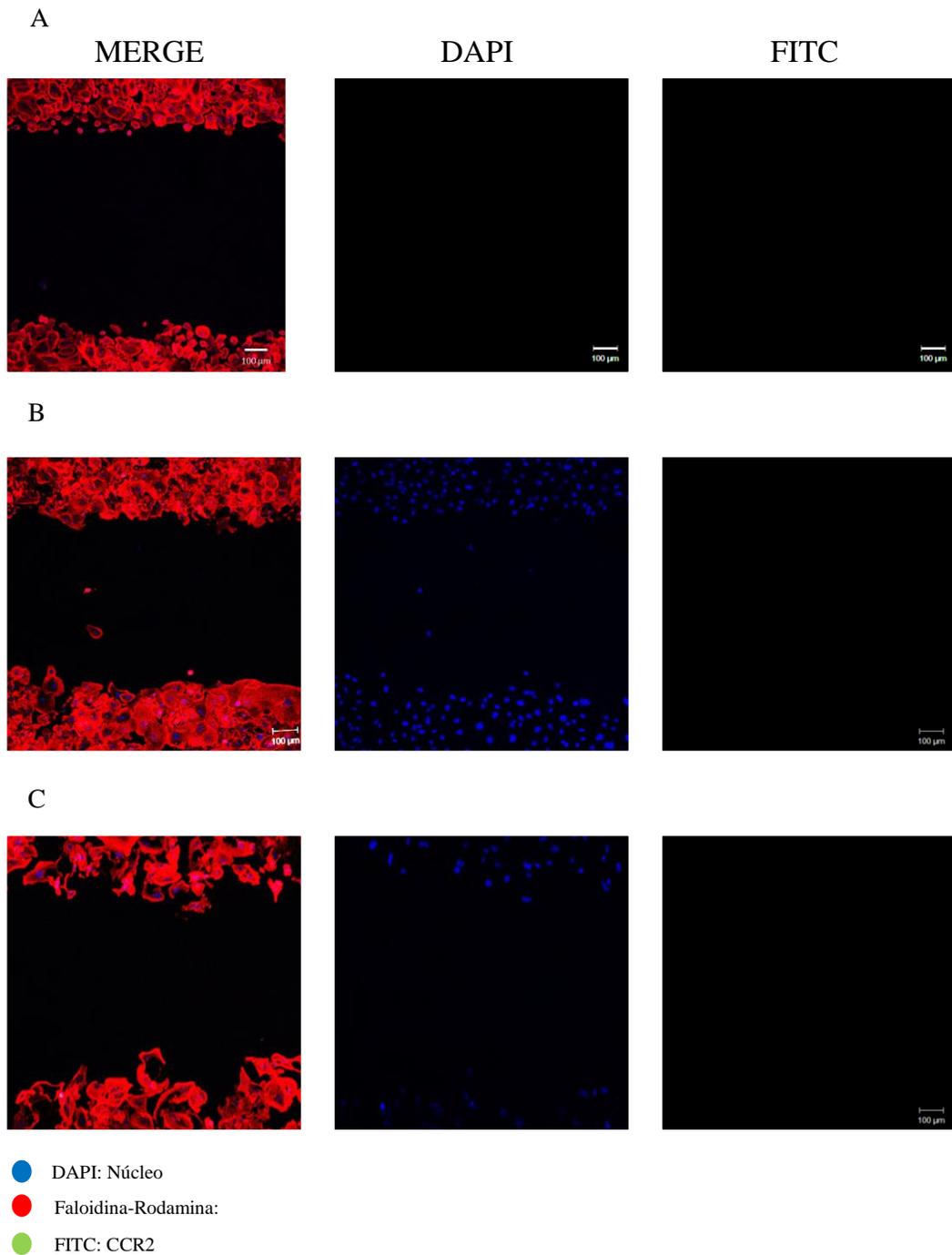
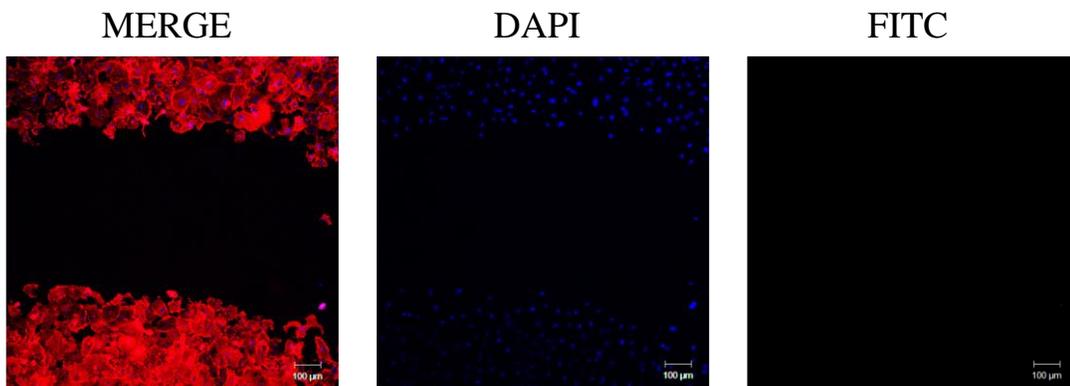


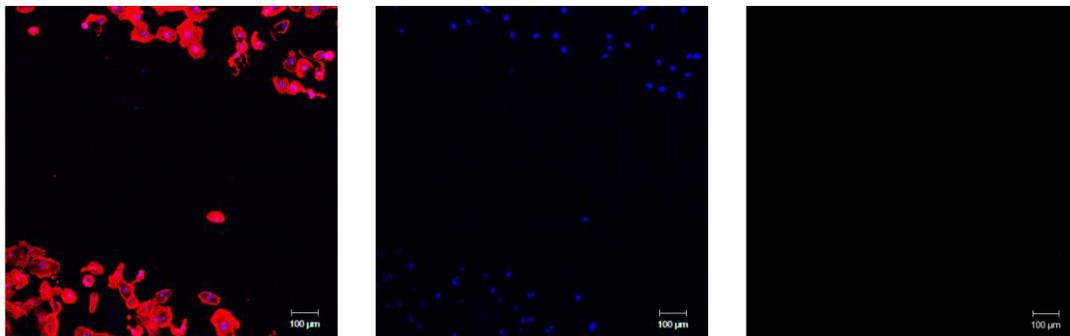
Figura 16. Ensayo de herida y cierre en células SK-OV-3 mantenidas en medio de cultivo. Se llevó a cabo utilizando 80,000 células crecidas en cubreobjetos y tratadas con Mitomicina C para inhibir la proliferación previo a realizar la herida. CCR2 se marcó con el mAbCKR-2B (dil 1:50) como anticuerpo primario y revelado con el anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a FITC (dil 1:100).

Se probó si la proteína Hp participa en la migración de las células SK-OV-3 a través de la expresión e interacción con el receptor CCR2, y se observa que a los tiempos establecidos de 24 y 48 h (figura 17 Panel A y B respectivamente) no hay expresión del receptor que concuerda con ausencia de migración.

A



B



- DAPI: Núcleo
- Faloidina-Rodamina:
- FITC: CCR2

Figura 17 Ensayo de herida y cierre en células SK-OV-3 estimuladas con Hp. Las células fueron tratadas con Mitomicina C para inhibir la proliferación y posteriormente con 250 µg de Hp, CCR2 se marcó con el mAbCKR-2B (dil 1:50) como anticuerpo primario y revelado con el anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a FITC (dil 1:100).

Hasta aquí los experimentos de inducción se habían realizado con un solo líquido ascítico, correspondiente a la paciente con el No. de expediente 152433D, el cual estimula la expresión de CCR2. Se decidió entonces realizar el ensayo incluyendo un segundo líquido ascítico, de la paciente con No. de expediente 151548D) con el fin de analizar si el fenómeno observado es generalizado a cualquier líquido ascítico o si esto correspondía a un efecto específico de una muestra en particular. En la figura 18 se muestra el resultado obtenido con el LA 1 donde el CCR2 se expresa a partir de las 48 h, lo que coincide con el inicio de la migración en estas células (Panel B).

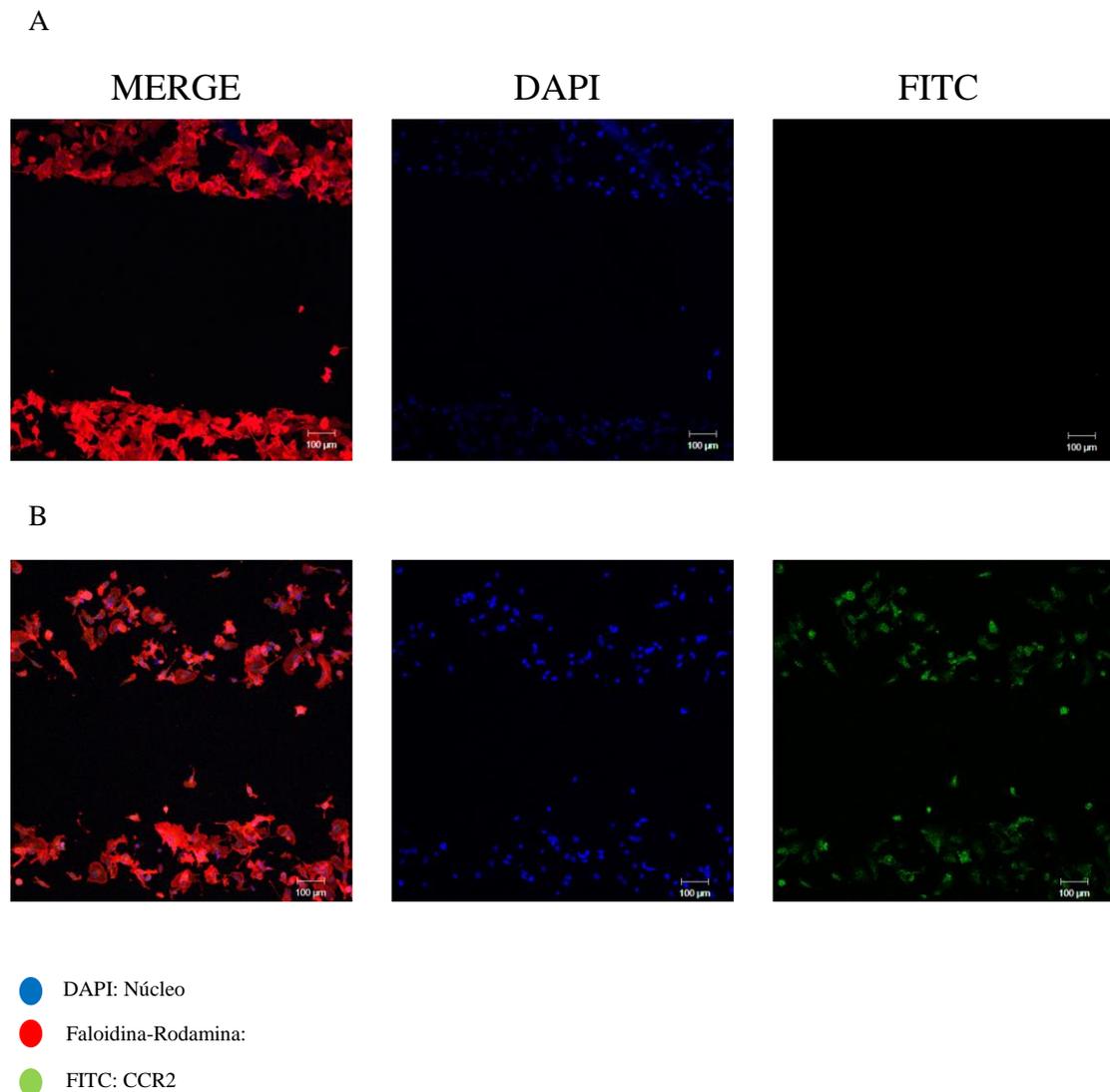


Figura 18 *Ensayo de herida y cierre en células SK-OV-3 estimuladas con LA 1. . Las condiciones de incubación con los anticuerpos fueron similares a las que se describen en la figura 16.*

El LA 2 muestra un efecto muy similar tanto en la expresión del receptor, como en la migración al tiempo de 48 h, Panel B), lo que sugiere que en los distintos líquidos ascíticos se encuentran presentes el o los elementos que estimulan la expresión del receptor que en este caso es uno de los principales mediadores de la migración en las células SK-OV-3 (Fig. 19).

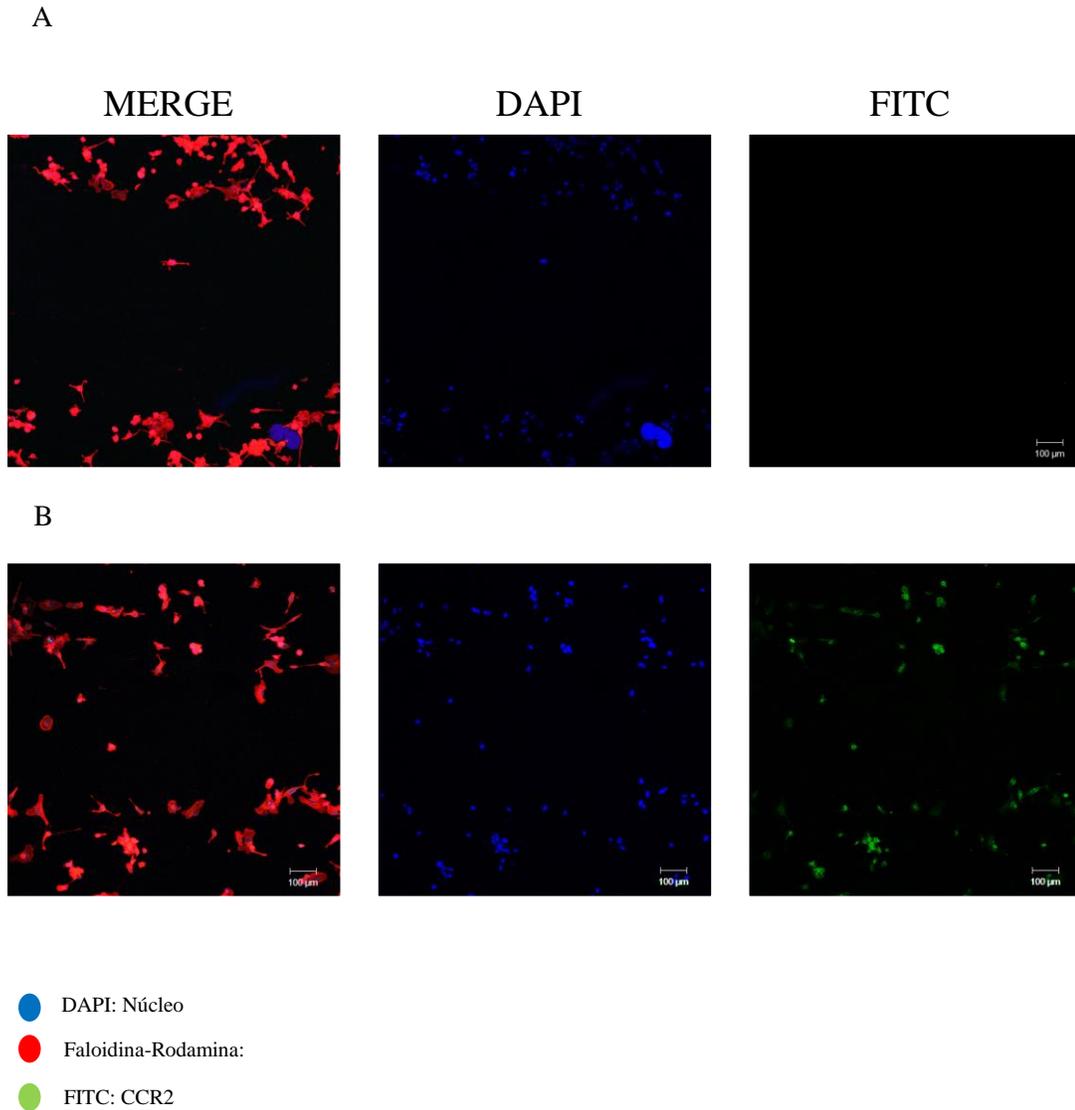


Figura 19 Ensayo de herida y cierre en células SK-OV-3 estimuladas con LA 2. . Las condiciones de incubación con los anticuerpos fueron similares a las que se describen en la figura 16.

X. DISCUSIÓN

El líquido ascítico es uno de los principales componentes del microambiente tumoral, ya que en él residen factores como VEGF, TNF α , IFN α , IL-1, IL-6, IL-12, metaloproteinasas y proteínas de fase aguda en especial Haptoglobina, todos ellos producidos por las células tumorales [29]. Dichos factores especialmente TNF α , IL-6 e IL-1 se han asociado con la expresión de receptores de quimiocinas sobre todo de CCR2 el cual ha sido documentado en múltiples líneas celulares de cáncer por su participación en la migración [30, 31, 32].

La migración se considera un proceso cíclico durante algunas etapas embrionarias que comienza con la adquisición de una polaridad celular y pérdida del fenotipo epitelial, debido a la recepción de señales externas o estímulos quimiotácticos, dicha polaridad forma parte de los procesos que ocurren durante la transición epitelial mesenquimal, donde las células muestran la formación de prolongaciones ya sean filopodios o lamelipodios y puntos focales que permiten tanto el desplazamiento celular como la adhesión a un nuevo sustrato. Este fenómeno es el mismo que se presenta durante la migración que caracteriza al proceso metastásico [33].

Los cambios morfológicos anteriormente mencionados se observaron cuando se llevó a cabo la estimulación de la línea celular SK-OV-3 con LA total proveniente de pacientes con cáncer de ovario. Estas células normalmente no expresan al receptor de quimiocinas CCR2, pero al ser estimuladas con este líquido son susceptibles de expresarlo; sin embargo, aún no se conoce el elemento específico contenido en el LA responsable de la expresión del receptor en la línea celular utilizada. Ya que se ha encontrado que la Hp es una proteína sobreexpresada tanto en el tejido tumoral como en el LA, se ha sugerido que tal vez ésta pudiera ser responsable de la expresión del receptor CCR2 e incluso actuar como uno de sus ligandos [13]. Por lo que se decidió realizar la estimulación de células SK-OV-3 únicamente con la proteína Hp, con la finalidad de probar si las células modificaban su citoesqueleto, observando que, aunque se presentan ciertos cambios en la morfología celular no es posible visualizar la formación de prolongaciones similares a filopodios como en el caso de las células estimuladas con LA, probablemente porque la Hp participa en otras funciones distintas a la migración (Fig. 3 y 4).

Se probó además si la Hp estimulaba la expresión de CCR2 mediante ensayos de western blot e inmunofluorescencia, a la concentración reportada de 250 μ g de Hp, donde no se obtuvieron resultados positivos de la expresión de CCR2 (Fig. 6), sino hasta que se aumentó la concentración a 500 μ g (Fig. 7). Sin embargo, la expresión del receptor en esta nueva condición, puede ser más una respuesta ante el estrés inducido por la elevada cantidad de Hp, como sucede ante otros tipos de estrés tales como la hipoxia, ya que, al comparar el nivel de expresión del receptor obtenido mediante la estimulación con líquido ascítico con respecto al obtenido con Hp, este último es mucho menor.

También se intentó probar si a través del propio ligando CCL2/MCP-1 se lograba estimular la expresión del receptor (Fig. 9), como sucede con algunas interleucinas, pero los resultados obtenidos sugieren que la estimulación de la expresión depende de algún otro elemento y no se lleva a cabo de forma directa por simple presencia del ligando, sino más bien es un proceso complejo que involucra un número mayor de factores y señales.

Si bien la expresión del receptor no está dada por la presencia de un único factor, ya sea Hp o MCP-1, resultaba interesante conocer si la activación podría desencadenarse por la interacción con alguna de estas dos proteínas, en especial con Hp por encontrarse en líquido ascítico como se ha mencionado anteriormente; esto se intentó probar a través de ensayos de Co-Inmunoprecipitación, aunque con los resultados obtenidos en este ensayo no fue posible determinar con certeza si se llevó a cabo la precipitación del receptor debido a que el peso molecular tanto de éste como de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas del anticuerpo precipitante son similares (figura 11). Lo que si se determinó mediante la Co-Inmunoprecipitación, es la presencia de Hp en la condición considerada como control, es decir las células SK-OV-3 mantenidas en medio de cultivo (figura 12), aunque en un principio se consideraba que estas células no expresaban la proteína debe recordarse el origen de la línea celular, el ovario, un tejido caracterizado por la producción basal de Hp; tal producción se ve incrementada cuando se añade un estímulo, en este caso el LA (figura 14), esto probablemente sea una respuesta similar a lo que ocurre de forma fisiológica, en donde la elevada producción de radicales libres en las células cancerosas da como resultado la elevación de proteínas protectoras, en este caso la Hp podría desempeñar esta función [16]

Dado que los resultados obtenidos de la Co-inmunoprecipitación no permitieron confirmar la interacción Hp-CCR2, se realizó un ensayo de Overlay (Fig. 13), el cual no muestra indicios de interacción entre estas proteínas, ni en el caso del receptor expresado por las células SK-OV-3 estimuladas con LA, ni en el caso del receptor expresado por macrófagos; esto probablemente pueda explicarse por el complejo modo en que la Hp es reconocida de forma normal por su receptor CD 163, en donde la Hp posee una forma tridimensional dimérica y además se encuentra acoplada a dos moléculas de Hemoglobina (Hb) para que el macrófago lleve a cabo su función habitual, que es captar a los complejos Hp-Hb y evitar así daño por radicales libres [16]. Todo lo anterior sugiere además que la Hp presente en el LA no se encuentra acoplada a moléculas de Hb y que probablemente se encuentra desempeñando alguna otra función aún desconocida.

Finalmente, al determinar la presencia del receptor CCR2 durante el proceso de migración, se probó de forma indirecta si este receptor interviene durante el proceso mencionado y es activado además por la Hp. Los resultados obtenidos en este ensayo sugieren que la compleja mezcla de factores presentes en el LA son responsables de la expresión del receptor, el cual efectivamente es uno de los mediadores de la migración (Fig. 18 y 19), en comparación con lo que sucede con la Hp, donde se comprueba una vez más que la proteína por sí sola no estimula la expresión de CCR2 y además no

interviene bajo nuestras condiciones, en la migración (Fig. 17). Los tiempos establecidos para el seguimiento de la migración muestran que ésta se inicia en un número escaso de células a partir de las 48 h cuando son estimuladas con LA, lo que sugiere que CCR2 no es el único elemento que participa en el proceso de migración, pero que indudablemente se encuentra presente durante el mismo.

XI. RESUMEN DE RESULTADOS

- 1.- De los estímulos estudiados únicamente el líquido ascítico logro inducir la expresión de CCR2 en las células SK-OV-3.
- 2.- No se logró demostrar la interacción directa entre Hp y CCR2, sin embargo, esta interacción podría ser indirecta.
- 3.- La inducción de la expresión de CCR2 concuerda con el inicio de la migración celular, lo que sugiere que este receptor participa en dicho proceso.

XXII. CONCLUSIÓN

El líquido ascítico induce la expresión del receptor CCR2 en las células SK-OV-3 en forma independiente de la presencia de Hp. Los resultados sugieren que CCR2 participa en el proceso de migración

XII. PERSPECTIVAS

- ❖ Identificar el o los elementos contenidos en el líquido ascítico responsables de la expresión de CCR2 en la línea celular SK-OV-3.
- ❖ Determinar si la activación de CCR2 es únicamente a través de su unión con los ligandos típicos a éste.
- ❖ Determinar si CCR2 participa directamente en la migración de células SK-OV-3.

XIII. REFERENCIAS

1. D. Gallardo-Rincón, D. Isla-Ortiz, G. Montalvo Esquivel, A. González Enciso, D. F. Cantú de León, (2011). "*Oncoguía: Cancer Epitelial de Ovario.*" *Cancerología* Vol 6. 2011. pp 53-60.
2. D. Gallardo-Rincón, R. Espinosa-Romero, W. R. Muñoz, R. Mendoza-Martínez, S. del Villar-Álvarez, L. Oñate-Ocaña, D. Isla-Ortiz, J. P. Márquez-Manríquez, A. Apodaca-Cruz, A. Meneses-García. "*Epidemiological overview, advances in diagnosis, prevention, treatment and management of epithelial ovarian cancer in Mexico*". *Salud pública de México*. Vol. 58. 2016. pp 302-308.
3. FIGO Guidelines. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynecol Obstet*. Vol. 7. 2014. pp 25-32.
4. R. J. Kurman and I. Shih. "*The Origin and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer a Proposed Unifying Theory*". *Am J Surg Pathol*. Vol. 34. 2011. pp 433-443.
5. Berridge, M. J. "*Signaling Defects and Disease.*" *Cell Signaling Biology* modulo 12. Vol 6. 2014. Available at:
<http://csb.portlandpresspublishing.com/content/6/csb0001012>
6. S. Y. Lim, A. E. Y., Alex N. Gordon-Weeks and R. J. Muschel (). "*Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis.pdf.*" *Oncotarget*, Advance Publications Vol. 7. 2016. pp. 28697- 28710.
7. D. Gallardo-Rincón, *et al.* *Tercer Consenso Nacional de Cáncer de Ovario 2011*. *Revista de Investigación Clínica* 2011; 63 (6): 665-702.

8. World Health Organization. Estimated cancer incidence, mortality worldwide, Globocan 2012. Available at: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
9. R. S. Freedman, M. Deavers, J. Liu, and E. Wang. “*Peritoneal inflammation – A microenvironment for Epithelial Ovarian Cancer (EOC)*”. Journal of Translational Medicine. Vol 2. 2004. pp 1-10.
10. P. Bragado, Y. Estrada, F. Parikh, S. Krause, C. Capobianco, H. G. Farina, D. M Schewe and J. A. Aguirre-Ghiso. “*TGF β 2 dictates disseminated tumour cell fate in target organs through TGF β -RIII and p38 α / β signaling*”. Nat Cell Biol. Vol. 15. 2014. pp 1-26.
11. Y. Yang-Hartwich, M. Gurrea-Soteras, N. Sumi, W. D. Joo, J. C. Holmberg, V. Craveiro, A. B. Alvero¹ and G. Mor. “*Ovulation and extra-ovarian origin of ovarian cancer*”. Scientific Reports. Vol. 4. 2014. pp 1-12.
12. B. Psaila, D. Lyden. “*The metastatic niche: adapting the foreign soil*”. Nature Reviews Cancer. Vol. 9. 2009. pp 285-293.
13. O. L. Garibay-Cerdenares, V. I. Hernández-Ramírez, J. C. Osorio-Trujillo, D. Gallardo-Rincón & P Talamás-Rohana. “*Haptoglobin and CCR2 receptor expression in ovarian cancer cells that were exposed to ascitic fluid: Exploring a new role of haptoglobin in the tumoral microenvironment*”. Cell Adhesion & Migration. Vol.9. 2015. pp 394-405
14. Maffei, M. F., M. Vottari, T. Gamucci, O. Costa, M. Lisi, S. Viegi, A. Ciampi, O. Bardi, G. Vitti, P. Pinchera, A. Santini, F. “*The obesity and inflammatory marker haptoglobin attracts monocytes via interaction with chemokine (C-C motif) receptor 2 (CCR2)*.” BMC Biol. Vol. 7. 2009. pp 1-14.

15. Lu, Y. Wang, M. Yan, P. Feng, L. Yuan, Y. Cai, X. Xia, M. Liu, J. Luo, L. Li. *"High serum haptoglobin level is associated with tumor progression and predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer"*. *Oncotarget*, Advance Publications 2016. pp 1-9
16. V. de Albuquerque Wobeto, T. Zaccariotto and M. Sonati. *"Polymorphism of human haptoglobin and its clinical importance"*. *Genetics and Molecular Biology*. Vol. 31. 2008. pp 602-620.
17. P. Cunha Sathler, A. Luiz Lourenço, L. Alves Miceli, C. Rangel Rodrigues, M. Girão Albuquerque, L. Mendes Cabral & H. Carla Castro. *"Structural model of haptoglobin and its complex with the anticoagulant ecotin variants: structure–activity relationship study and analysis of interactions"*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. Vol. 29. 2014. pp 256–262
18. M. Madsen, H. J. Moller, M. J. Nielsen, C. Jacobsen, J. H. Graversen, T. Van den Berg, and S. K. Moestrup. *"Molecular Characterization of the Haptoglobin-Hemoglobin Receptor CD163"*. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 279. 2004. pp 51561–51567
19. C. B. Chen, Y. C. Su, T. T. Huang, H. C. Ho, Y. T. Chang, Y. T. Tung, W. C. Lee. *"Differentially expressed serum haptoglobin alpha chain isoforms with potential application for diagnosis of head and neck cancer"*. *Clinica Chimica Acta* 398. 2008. pp 48–52.
20. O. L. Garibay-Cerdenares, V. I. Hernández-Ramírez, J. C. Osorio-Trujillo, M. Hernández-Ortíz, D. Gallardo-Rincón, D. Cantú de León, S. Encarnación-Guevara, J. C. Villegas-Pineda and P. Talamás-Rohana. *"Proteomic identification of fucosylated haptoglobin alpha isoforms in ascitic fluids and its localization in ovarian carcinoma tissues from Mexican patients"*. *Journal of Ovarian Research*. Vol. 7. 2014. pp 2-12.

21. Y. A. Berchiche, S. Gravel, M. E. Pelletier, G. St-Onge, and N. Heveker. *“Different Effects of the Different Natural CC Chemokine Receptor 2b Ligands on β -Arrestin Recruitment, Gai Signaling, and Receptor Internalization”*. Molecular Pharmacology. Vol. 79. 2010. pp 488-498.
22. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. *“Molecular Biology of The Cell”*. 6^o Edition. Chapter 15. pp 832-885
23. J. Corbisier, C. Gales, A. Huszagh, M. Parmentier and J. Springael. *“Biased Signaling at Chemokine Receptors”*. J. Biol. Che. Vol. 290, 2015. pp 9542–9554.
24. M P. Hayes and D. L. Roman. *“Regulator of G Protein Signaling 17 as a Negative Modulator of GPCR Signaling in Multiple Human Cancers”*. American Association of Pharmaceutical Scientists. Vol. 18. 2016. pp 550-559
25. A. A. Preobrazhensky, S. Dragan, T. Kawano, M. A. Gavrilin, I. V. Gulina, L. Chakravarty and P. E. Kolattukudy. *“Monocyte Chemotactic Protein-1 Receptor CCR2B is a glycoprotein that has tyrosine sulfation in a conserved extracellular N-Terminal region”*. The Journal of Immunology. Vol. 165. 2016. pp 5295-5303.
26. M. Narisada, S. Kawamoto, K. Kuwamoto, K. Moriwaki, T. Nakagawa, H. Matsumoto, M. Asahi, N. Koyama, E. Miyoshi. *“Identification of an inducible factor secreted by pancreatic cancer cell lines that stimulates the production of fucosylated haptoglobin in hepatoma cells”*. Biochemical and Biophysical Research Communications 377 (2008) 792–796.
27. Balkwill F. *“Cancer and the chemokine network”*. Nat Rev Cancer. Vol. 4. 2004. pp 540-50.

28. J. C. Villegas-Pineda, V. I. Hernández-Ramírez, D. Gallardo-Rincón, D. Cantú de León, Pérez-Montiel-Gómez, P. Talamás Rohana. *"Integrins and haptoglobin: Molecules overexpressed in ovarian cancer."* Pathol. Res. Pract. Vol. 211. 2015. pp 973-981.
29. O. Sipak-Szmigiel, P. Włodarski, E. Ronin-Walknowska, A. Niedzielski, B. Karakiewicz, S. Słucznanowska-Głąbowska, M. Laszczyńska, W. Malinowski. *"Serum and peritoneal fluid concentrations of soluble human leukocyte antigen, tumor necrosis factor alpha and interleukin 10 in patients with selected ovarian pathologies"*. Journal of Ovarian Research (2017) 10:25
30. Fang WB, Jokar I, Zou A, Lambert D, Dendukuri P, Cheng N. *"CCL2/CCR2 chemokine signaling coordinates survival and motility of breast cancer cells through Smad3 protein and p42/44 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent mechanisms"*. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 287. 2012. pp 36593–36608,
31. H. Chiu, K. Sun, S. Chen, H. Wangc, M. Lee, Y. Tsou, S. Jwo, G. Sun, S. Tang. *"Autocrine CCL2 promotes cell migration and invasion via PKC activation and tyrosine phosphorylation of paxillin in bladder cancer cells"*. Cytokine. Vol. 59. 2012. pp 423–432
32. J. Yang, J. Chen, C. Xie, W. Xia, C. Jiang, T. Zeng, Y. Ye, L. Ke, Y. Yu, H. Liang, X. Guan, X. Guo, Y. Xiang. *"CCL2-CCR2 axis promotes metastasis of nasopharyngeal carcinoma by activating ERK1/2-MMP2/9 pathway"*. Oncotarget, Advance Publications Vol. 7. 2015. pp 15632-15645
33. P. Friedl, Y. Hegerfeldt, M. Tusch. *"Collective cell migration in morphogenesis and cancer"*. Int. J. Dev. Biol. 48: 441-449 (2004). pp 441-449.