

Expresión de las isoformas $\beta 1$ y $\beta 2$ de la Na,K-ATPasa en células de líquido ascítico de pacientes con cáncer de ovario

Na,K-ATPase $\beta 1$ and $\beta 2$ isoforms expression in cells from ascitic fluid from patients suffering from ovarian cancer

Trabajo de Fin de Grado

David Orrego Arias

Tutores: Prof. Pablo Martín Vasallo y Dra. Rebeca González Fernández

Grado en Biología

Junio de 2018

Resumen

El cáncer de ovario es uno de los cánceres con mayor tasa de mortalidad en mujeres. CA125 es el marcador tumoral más usado en este tipo. Un efecto de este cáncer es la acumulación de líquido ascítico en la cavidad peritoneal, en el que también aparecen células del mesotelio peritoneal y de ovario desprendidas del tejido tumoral. Por otro lado, estudios afirman que en cáncer se produce una reducción de la expresión de la subunidad β de la Na,K-ATPasa, favoreciendo a la pérdida de polaridad y proliferación.

El objetivo de este estudio fue aislar las células del líquido ascítico de pacientes con cáncer de ovario para, por medio de inmunohistoquímica, ver como varía la expresión de las isoformas $\beta 1$ y $\beta 2$ de Na,K-ATPasa con respecto al tiempo y al origen del cáncer, utilizando CA125 como marcador tumoral específico. Se estudiaron dos tipos de cáncer de ovario: de origen ovárico y de origen peritoneal.

Se observó como la expresión de CA125 aumentaba con los pases del cultivo de células, siendo mayor el número en el cáncer de origen ovárico que el de origen peritoneal. Por otro lado, en el cáncer de origen peritoneal no hubo cambio de expresión de las isoformas entre el pase 1 y 2 mientras que en el cáncer de origen ovárico si se apreció una reducción. Las isoformas $\beta 1$ y $\beta 2$ presentaban la misma localización (membrana plasmática, envoltura nuclear y citoplasma) y podrían estar implicadas en el proceso tumoral del cáncer de ovario.

Abstract

Ovarian cancer is one of the cancers with higher mortality rate in women. CA125 is a tumour marker currently used in this cancer. Ascitic fluid accumulation in the peritoneal cavity is a frequent complication in ovarian cancer. This also contains peritoneal mesothelial cells and ovary cells from the tumour tissue. It has been reported a decrease of Na,K-ATPase β subunit expression in several cancers favouring loss of polarity and proliferation.

The goal of this study was to isolate cells from ascitic fluid from patients suffering from ovarian cancer in order to perform immunohistochemistry studies of the expression patterns of Na,K-ATPase $\beta 1$ and $\beta 2$ isoforms and their relationships to the tumour process, using CA125 as a specific tumour marker. Two types of ovarian cancer were studied: from ovarian origin and from peritoneal origin.

CA125 expression increased with the passage of the cell culture, the number in ovarian origin cancer was more than peritoneal origin cancer. In peritoneal origin cancer, there was not change in isoforms expression patterns between passage 1 and 2, whereas in ovarian origin cancer there was a decreasing pattern of expression. The $\beta 1$ and $\beta 2$ isoforms presented the same location (plasma membrane, nuclear envelope and cytoplasm) and could be involved in the tumour process of ovarian cancer.

Tabla de contenido

Introducción	1
Cáncer de ovario	1
Líquido ascítico	2
CA125	2
Na,K-ATPasa	3
Inmunohistoquímica	3
Objetivos	4
Material y métodos	5
Muestras y aislamiento de células del líquido ascítico	5
Cultivo de células	6
Siembra y almacenamiento	6
Levantamiento de células	6
Inmunohistoquímica	7
Preparación de las placas	7
Fijación de células	7
Incubación de anticuerpos	7
Resultados	9
Aislamiento de células del líquido ascítico	9
Inmunolocalización de CA125	10
Evaluación de la expresión de CA125	11
Inmunolocalización de la subunidad $\beta 1$ de Na,K-ATPasa	11
Paciente 1	11
Paciente 2	14
Inmunolocalización de la subunidad $\beta 2$ de Na,K-ATPasa	15
Paciente 1	15
Paciente 2	18
Expresión de las isoformas $\beta 1$ y $\beta 2$ de Na,K-ATPasa	20
Discusión	21
De la metodología empleada	21
Método estadístico	21
Aislamiento y cultivo de células	21
Inmunohistoquímica	21

De los resultados obtenidos	22
Expresión de CA125	22
Expresión de la subunidad $\beta 1$ de Na,K-ATPasa y $\beta 2$	23
De los resultados tomados de su conjunto	25
Conclusiones	26
Bibliografía	27

Agradecimientos

A mi tutor, Prof. Pablo Martín Vasallo por aceptarme para realizar este trabajo, aportarme todos los conocimientos sobre el tema de estudio y ayudarme en todo momento.

A mi cotutora, Dra. Rebeca González Fernández por guiarme en el proceso de trabajo en el laboratorio y siempre estar dispuesta resolverme cualquier duda.

A Miriam Dorta, médica del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario de Nuestra Señora de Candelaria, por extraer y proveernos las muestras de líquido ascítico de las pacientes.

A Carmen Gutiérrez, compañera de laboratorio durante el TFG, por ayudarme, apoyarme y ser tan fácil trabajar con ella en el laboratorio.

A Rita Martín Ramírez, becaria del laboratorio, por preocuparse por nosotros y nuestro trabajo ayudando y resolviendo dudas.

Introducción

Cáncer de ovario

El cáncer de ovario es el quinto cáncer más común en mujeres y el cuarto que les causa más muertes. Las causas concretas del cáncer aún son desconocidas, pero un nulo o reducido número de embarazos, un pronto ciclo menstrual o una tardía menopausia son factores de riesgo para esta enfermedad. (Ledermann et al., 2013). Desde un punto de vista genético, tan solo en el 10% de los cánceres de ovario se es capaz de conocer el lugar de mutación en la célula, siendo BRCA1 y BRCA2 los genes más susceptibles (Alsop, Fereday, & Meldrum, 2012).

Los síntomas en el cáncer de ovario no se suelen detectar hasta un periodo avanzado. La ascitis y las masas abdominales que se producen por el cáncer tienden a hacer que la paciente sufra dolores abdominales, náuseas, vómitos, anorexia y rápida saciedad (Hamilton, Peters, Bankhead, & Sharp, 2009).

Por lo general, este tipo de cáncer tiene su origen en células epiteliales (Scully, Scully, Sobin, & Serov, 1999). Se reconocen distintos subtipos de este cáncer según su histología, de los cuales destacan:

- Carcinoma seroso: son los más comunes, alrededor de un 80%. Recientemente se ha descubierto que el carcinoma seroso de alto grado y de bajo grado son distintos en cuanto a la mutación que los provoca.
- Carcinoma endometriode: Se ha comprobado que las mutaciones en AR11A aparecen en endometriosis (el endometrio crece fuera de este) y en cáncer de endometrio, siendo la endometriosis una de las causas del cáncer de ovario.
- Carcinoma de células claras: alrededor del 5% de los cánceres de ovarios son de este tipo. Al igual que en el carcinoma endometriode, mutaciones en AR1D1A están asociados al cáncer en células claras.
- Tumores de bajo potencial de malignidad (tumores borderline): suponen entre el 10%-15% del cáncer de ovario. Los tumores borderline serosos son los más comunes pero los borderline mucinosos y borderline endimetriode también aparecen (Ledermann et al., 2013).

Líquido ascítico

La ascitis es la acumulación de líquido ascítico en la cavidad peritoneal provocado por distintos cánceres, por infecciones o hipertensión portal (Oey, van Buuren, & de Man, 2016).

Este trabajo estudia la ascitis maligna causada por carcinoma de ovario seroso de alto grado. Se ha comprobado que las pacientes con este tipo de ascitis pierden hasta cinco años de vida, por lo que se considera que puede ser un factor que favorezca a la progresión del cáncer (Kipps, Tan, & Kaye, 2013). El líquido presenta en su entorno un conjunto de factores proinflamatorios y abundantes células mesoteliales peritoneales (las que cubren la cavidad abdominal). Además, también aparecen células tumorales procedentes de los ovarios y/o trompas de Falopio. Las células tumorales sobreviven y proliferan en el líquido para más tarde implantarse en el mesotelio de la cavidad peritoneal (Matte et al., 2015). La interacción entre las células tumorales de un cáncer de ovario y las de mesotelio peritoneal en la ascitis se cree que tiene relevancia en la progresión del tumor (Ren et al., 2006).

CA125

Hoy en día es el marcador tumoral más usado para detectar cáncer de ovario. Esta proteína se encuentra dentro de la familia de las mucinas, con un tamaño de 20-200 kDa y abundantes N y O-glicosilaciones. Es una glicoproteína transmembrana compuesta por un dominio citoplasmático corto, un dominio transmembrana y un largo dominio extracelular glucosilado (Salдова et al., 2013).

En cuanto a su función biológica todavía se desconoce la mayoría de sus implicaciones. Varios estudios exponen la relación de estas proteínas con el sistema inmune (Weiland, Martin, Oehler, & Hoffmann, 2012). Las N-oligosacáridos de la glicoproteína se unen directamente a las células NK (células asesinas) e inhiben su acción contra estas, es decir, una célula con gran expresión de CA125 impide que las NK actúen sobre su membrana (Patankar et al., 2005). Por otro lado, se ha demostrado la interacción con la galectina 1, la cual se considera una proteína que en células tumorales es capaz de evadir la respuesta inmune (Rabinovich & Rubinstein, 2001). La mesotelina es otra proteína de unión con CA125 que se expresa de forma normal en células mesoteliales pero en cáncer de ovario se considera un factor de proliferación (aumenta su expresión en este tejido tumoral)(Hassan et al., 2006).

Na,K-ATPasa

La bomba de sodio potasio es una proteína embebida en la membrana plasmática de las células animales. Transporta tres moléculas de sodio al exterior celular y dos de potasio al interior en contra de gradiente electroquímico. También se conoce que es un receptor de los glucósidos cardiotónicos (Jorgensen, Håkansson, & Karlsh, 2003). Numerosos estudios han relacionado Na,K-ATPasa con el citoesqueleto, lo que se especificó después a relaciones con la polarización, supresión de la invasión y la movilidad celular (Balasubramaniam, Gopalakrishnapillai & Barwe, 2015; Kravtsova et al., 2015).

La Na,K-ATPasa está formada por dos subunidades unidas no covalentemente, la subunidad α (122 kDa) y la subunidad β (55 kDa). Sin embargo se encuentran distintas isoformas predominantes (cuatro para la subunidad α y tres para la β) de cada subunidad según el tejido en el que se encuentre (Therien & Blostein, 2000). En determinadas células y situaciones se les asocia un tercer péptido, la subunidad γ (Mobasheri et al., 2000).

La isoforma $\beta 1$ es una proteína glucosilada que regula el transporte de sodio y potasio y facilita la inserción del complejo α - β en la membrana plasmática. Esta se presenta en la mayoría de los tejidos y células. Por otro lado, la isoforma $\beta 2$ está estrechamente relacionada con la adhesión celular y se encuentra principalmente en músculo esquelético y tejido nervioso (Mobasheri et al., 2000). Ambas isoformas β son necesarias para mantener la polaridad de las células epiteliales pues son indispensables para la asociación que presenta la subunidad α con la actina del citoesqueleto (Rajasekaran et al., 2001). Existen estudios que comprueban como en células cancerígenas se produce la pérdida de la subunidad β (Inge et al., 2008), lo que podría favorecer a la pérdida de la polaridad, la transición epitelial a mesenquimal (EMT), a la migración celular y a la proliferación.

Inmunohistoquímica

Este método se basa en la demostración de un antígeno (proteína a estudiar) en un tejido o célula por medio de un anticuerpo específico. Si se produce la unión va a tener lugar una reacción con emisión de color, la cual se aprecia por medio de microscopia óptica o se emite fluorescencia gracias a un fluoróforo que se observa con microscopia de fluorescencia (Ramos-Vara, 2005).

Objetivos

En este trabajo pretendemos continuar el estudio de las células de líquido ascítico tumoral, mediante aislamiento, cultivo y estudio de patrones de expresión diferencial de proteína por medio de inmunohistoquímica.

Objetivos específicos:

1. Aislamiento de células de ascitis maligna de pacientes con cáncer de ovario de origen distinto.
2. Estudio, de las variaciones en las poblaciones celulares obtenidas según el número de pases del cultivo y entre pacientes con distinto tipo cáncer de ovario.
3. Estudio de los patrones de expresión de las isoformas $\beta 1$ y $\beta 2$ de la subunidad β de Na,K-ATPasa en las células aisladas y sus variaciones con el número de pases y en pacientes con distinto tipo de cáncer de ovario.

Material y métodos

Muestras y aislamiento de células del líquido ascítico

El estudio se realizó en pacientes del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario de Nuestra Señora de Candelaria (HUNSC; Santa Cruz de Tenerife, España) y fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de La Laguna (San Cristóbal de La Laguna, España) y el Comité de Ética del HUNSC. Las pacientes firmaron un consentimiento informado antes del comienzo del estudio.

Se estudió el líquido ascítico de dos pacientes con cáncer de ovario, la paciente 1 diagnosticada de carcinoma seroso de alto grado de origen ovárico en estadio IIIC, mientras que la paciente 2 presenta un carcinoma seroso de alto grado de origen peritoneal en estadio IIIC. La manipulación de ambas muestras fue la misma.

El líquido ascítico aislado de la paciente [Ilustración 1] se centrifugó a 2000 rpm, 20 minutos y con una temperatura de 17°C. Se descartó el sobrenadante, se añadieron 10ml de medio F12K (Nutrient mixture F-12 Ham, Sigma) y se resuspendió el pellet con ese medio para después centrifugarlo a 1500 rpm durante 15 min a 17°C. Se retiró el sobrenadante y se añadió a cada tubo Falcon 5ml de medio F12K con un 10% de suero fetal bobino (FBS) y mix de antibiótico 1x (Sigma Cell Culture + 25µg/ml de Anfotericina B), este es el medio de cultivo estándar que se empleó durante todo el proceso. Se resuspendió el pellet con bastante insistencia ya que se debe intentar que las células estén separadas.



Ilustración 1: Líquido ascítico extraído de paciente con cáncer de ovario

A continuación, se realizó el conteo de células en la muestra. Se empleó el contador TC20™ Automated Cell Counter (BioRad), mezclando 5µl de cultivo con Trypan Blue (BioRad) en una proporción 1:1.

Cultivo de células

Siembra y almacenamiento

Las células se sembraron en placas o frascos de cultivo de distintos tamaños, según el experimento a realizar, poniendo en cada uno de ellos un número adecuado de las mismas y de medio de cultivo. Se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ [Ilustración 2]. Se cambió el medio de cultivo cada par de días para que las células tengan nutrientes disponibles y no estén en condiciones de estrés.

Por otro lado, se congelaron alícuotas de cultivo con 8% de DMSO en nitrógeno líquido para una posible utilización posterior y pellet de células a -80°C para futuros experimentos.

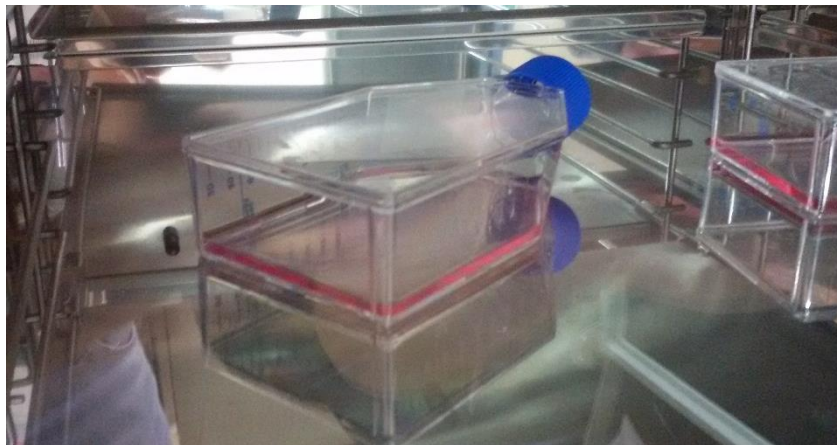


Ilustración 2: Frasco de cultivo con células procedentes del líquido ascítico

Levantamiento de células

Las células se levantaron cuando alcanzaron el 90-95% de confluencia. Se eliminó el medio de cultivo y se añadió tripsina/EDTA a 37°C. Se incubó 5 minutos y se golpeó sobre una superficie para ayudar a la separación de las células. Se volvió a incubar durante 2 min. Se mezcló en una proporción 1:1 con medio de cultivo y se centrifugó a 2300 rpm durante 15min a unos 17°C. Se resuspendió el pellet con medio de cultivo. Se contaron las células y se sembraron según el experimento a realizar. Cada levantamiento de células se considera un pase.

Inmunohistoquímica

Preparación de las placas

Se prepararon placas de cuatro pocillos. Los cubres de 15mm que se usaron permanecían en etanol durante mínimo un día antes para evitar contaminación. Estos cubres se pasaron por un mechero para secar el etanol y se pusieron en los pocillos con una gota de agua estéril en la base. Se cubrieron los pocillos con solución gelatina a 0,25mg/ml (Sigma Tipo A: de piel de porcino) y se dejaron 30 minutos en U.V. Se eliminó el sobrante y se añadió poli-L-lisina 2µg/µl (Sigma P-6282) en tampón borato 0,15M pH8,4 hasta cubrir durante 1 hora. Se aspiró y se hicieron dos lavados con PBS 1x (80g NaCl, 2g KCl, 14,4g de Na₂PO₄·2H₂O y 2,4g KH₂PO₄). Se hizo un último lavado con agua-mQ. Se eliminó el agua y se dejaron las placas toda la noche en U.V. sin la tapa puesta. A la mañana siguiente se cerraron las placas y se les puso Parafilm. Se guardaron en nevera a 4°C hasta que se necesitaron. Media hora antes de su uso se hidrató con PBS 1x que se retiró antes de sembrar las células.

Fijación de células

Para la fijación, las células debían estar más o menos próximas en el cubre pero no aglutinadas. Se retiró el medio de cultivo y se lavó hasta tres veces con PBS 1x. Se añadió metanol 100% hasta cubrir y se mantuvo en el congelador a -20°C durante 6 min y en posición completamente horizontal. Se eliminó el metanol y se volvió a lavar con PBS 1x por dos veces. Se añadió una tercera vez PBS, pero en este caso no se eliminó. Se cerraron las placas con Parafilm y se guardaron en la nevera a 4°C.

Incubación de anticuerpos

Se quitó el PBS de los pocillos y se bloqueó con buffer de bloqueo (1% BSA, 0,1% gelatina de pescado, 0,5% Tritón X-100, 0,05% azida sódica, 0,01M PBS a pH 7,2-7,4) durante 30 minutos en agitación. Se añadieron 75µl de Anti-CA125 mouse (CA-125 (OC125), Roche, Basilea, Suiza) durante 30 minutos en agitación. Pasado este tiempo se lavó con buffer de bloqueo y se incubó con los anticuerpos primarios (Rabbit SpET β1, 1:600; Rabbit SpET β2, 1:600) diluidos en buffer de bloqueo durante toda la noche a 4°C y agitación (Tabla 1).

Al día siguiente se lavó 3 veces con buffer de lavado (TBS 1x (0,5M Tris Base, 9% NaCl y pH 8,4) + 0,5% TWEEN 20) durante 10 minutos en agitación a temperatura ambiente. Se añadieron los anticuerpos secundarios anti rabbit (FITC-conj. Anti-rabbit, 1:200) y anti mouse

(DyLight®650- conj. Anti-mouse, 1:100) diluidos en solución de lavado a la concentración indicada durante 45 min [Tabla 1]. La manipulación de estos anticuerpos secundarios se realizó con las luces apagadas.

Se lavó tres veces durante 10 minutos con buffer de lavado. Se pasaron los cubres de los pocillos al porta, al cual previamente se le había puesto una gota del marcador nuclear “Prolong Diamond antifade Mountant with DAPI”. Se colocó el cubre dado la vuelta sobre el porta y se apretó ligeramente para extender el marcador.

Se hizo una primera observación en el microscopio de fluorescencia (Olympus OM-50) para comprobar la existencia de marcaje. La muestra se conservó a 4°C hasta su posterior observación en el microscopio confocal (Leica Microsystem).

Anticuerpo	Epítipo	Tipo	Clase	Hospedador	Dilución	Fuente
Anti-CA125 mouse	CA125	P	M	R	-	Roche
SpETβ1	Na,K-ATPase β1	P	P	Cn	1:600	LBD
SpETβ2	Na,K-ATPase β2	P	P	Cn	1:600	LBD
DyLight®650- conj. Anti-mouse	IgG mouse	S	P	Cb	1:100	Abcam
FITC-conj. Anti-rabbit	IgG rabbit	S	P	Cb	1:200	Sigma- Aldrich

Tabla 1: Anticuerpos usados durante este TFG. Tipo: P (primario), S (secundario). Clase: P (policlonales), M (monoclonales). Hospedador: R (ratón), Cn (conejo), Cb (cabra). Fuente: LBD (Laboratorio de Biología de Desarrollo).

Resultados

Aislamiento de células del líquido ascítico

Se obtuvo aproximadamente un litro de líquido ascítico de cada paciente. En una primera observación podemos apreciar que el líquido de la paciente 1 era menos hemático y más limpio de tejido que el de la paciente 2. Tras el aislamiento, en ambas muestras se observó que existía abundante número de células.

Se tomaron fotografías por microscopía óptica de las células aisladas de la paciente 1 [Figura 1]. En estas imágenes se puede apreciar la cantidad de eritrocitos que presentaba la muestra [Figura 1]. De las células nucleadas aisladas, las vivas evitan la entrada de Trypan blue, mientras que las muertas no tienen esa capacidad selectiva y se tiñen de azul. Son células grandes y redondeadas en su mayoría [Figura 1].

En estas imágenes no se distinguen los tipos de células. Para determinar si son tumorales se llevó a cabo un estudio inmunohistoquímico con el marcador específico Ca-125.

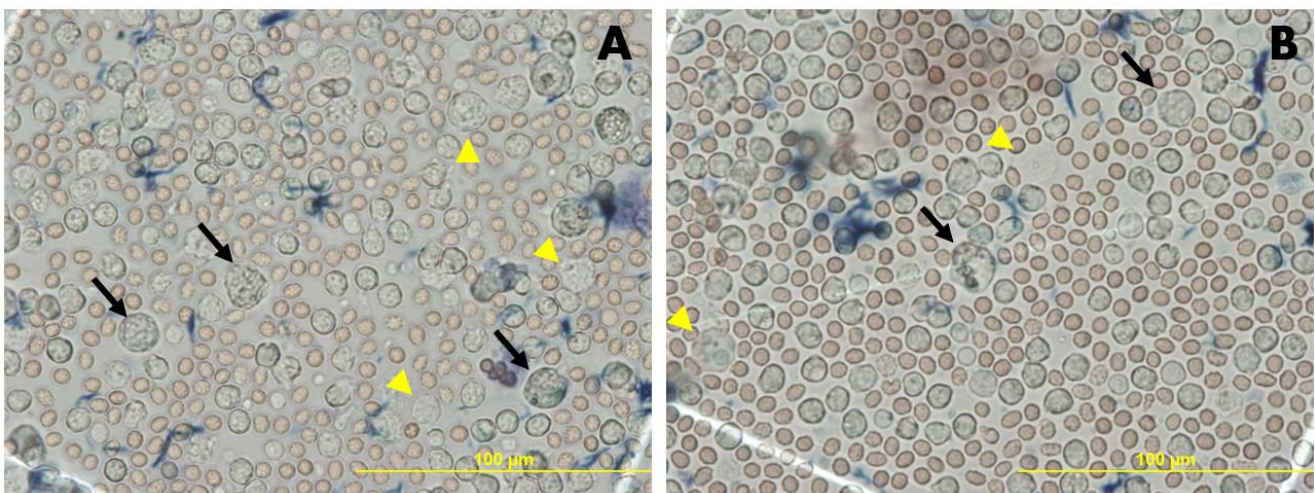


Figura 1: Células aisladas de líquido ascítico de paciente con cáncer de ovario (paciente 1). Tinción en vivo con Tripan Blue. Las flechas negras señalan células muertas. Las puntas de flecha amarillas señalan células vivas. A) Células obtenidas de líquido ascítico menos hemático. B) Células de líquido más hemático.

Tras el pase 1, las células de la paciente 1 se observaron al microscopio con óptica Nomarski [Figura 2]. Algunas células presentan una morfología alargada, mientras que otras son más redondeadas.

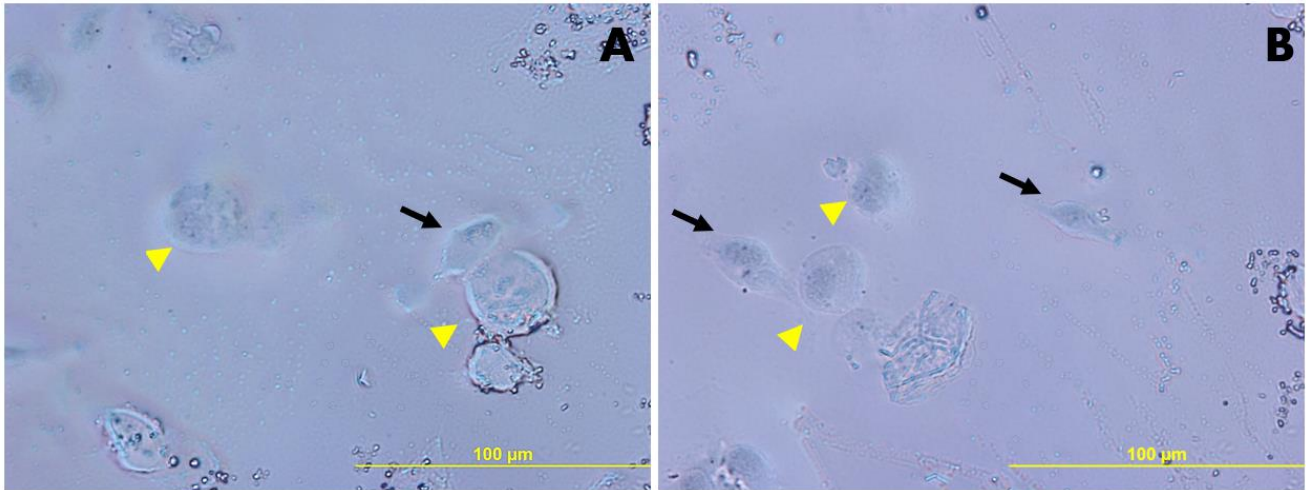


Figura 2: Fotografías con óptica Nomarski del pase 1 de la paciente 1. Las flechas negras señalan las células con morfología alargada. Las puntas de flecha amarillas indica las células redondeadas.

Inmunolocalización de CA125

Con el fin de determinar el número de células tumorales de ovario presentes en la muestra se realizó un marcaje con CA125, estas células aparecen marcadas positivamente con CA125 (CA125⁺) [Figura 3, panel E]. La inmunofluorescencia positiva para CA125 se localiza en la membrana plasmática, rodeando a las células [Figura 3, panel E] o parte de ellas [Figura 7, panel E]. Los núcleos de las células se identificaron con DAPI.

Se contó el número de células CA125⁺ con respecto al número de células totales (marcadas con DAPI; núcleos en azul) y se calculó la proporción de células tumorales ováricas en el conjunto de células, teniendo en cuenta que hay células con más de un núcleo. Esto se hizo para las dos pacientes analizadas en los distintos pases:

- En la paciente 1 los recuentos variaron entre un 15 y un 20% de células marcadas con CA125 en el pase 1 [Figura 3 y 7, panel B], mientras que en el pase 2 había en torno al 30-35% de células CA125⁺ [Figura 4 y 8, panel B].
- En la paciente 2 tan solo se apreció una sola célula marcada de manera específica con CA125 en el pase 1 [Figura 9, panel B]. Mientras que en el pase 2 fue de un 10-15% [Figura 6 y 10, panel B].

Evaluación de la expresión de CA125

La tabla 2 resume el porcentaje de células CA125⁺ en las pacientes 1 y 2 con respecto al total de células.

	Pase 1	Pase 2
Paciente 1	15-20%	30-35%
Paciente 2	1-5%	10-15%

Tabla 2: Porcentaje de células positivas para CA125 en las pacientes 1 y 2 y en sus respectivos pases.

Inmunolocalización de la subunidad $\beta 1$ de Na,K-ATPasa

Paciente 1

En el pase 1, la señal de fluorescencia aparece en las células como un patrón de puntos verdes, más predominantes en las membranas citoplasmáticas y envuelta nuclear [Figura 3, panel A], aunque también aparecen gránulos agrupados en el citoplasma [Figura 3, panel F].

En el pase 2, subunidad $\beta 1$ de Na,K-ATPasa se localiza menos en la membrana plasmática, siendo más común en la envuelta nuclear [Figura 4, panel A y D]. Además, la distribución en el citoplasma es más reducida (menos presencia de acumulaciones) [Figura 4, panel A].

No se apreciaron diferencias en la cantidad y distribución de la subunidad $\beta 1$ de Na,K-ATPasa de aquellas células marcadas con CA125 y aquellas que no lo están.

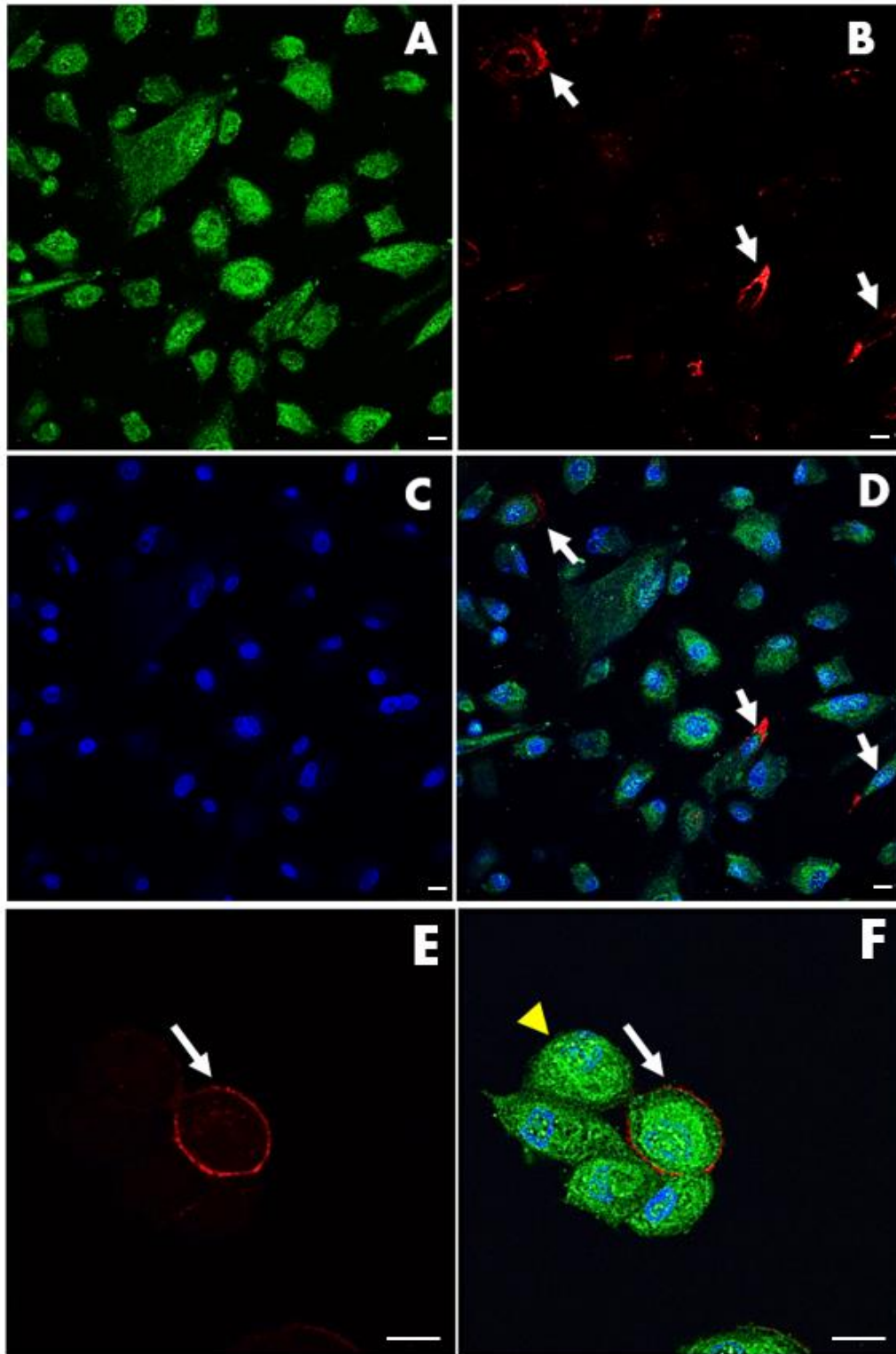


Figura 3: Inmunolocalización por fluorescencia de la subunidad $\beta 1$ Na,K-ATPasa en células de pase 1 de ascitis de paciente con cáncer de ovario (paciente 1). A) Inmunofluorescencia de la subunidad $\beta 1$ de Na,K-ATPasa. B) Marcaje con CA125. C) Marcaje con DAPI. D) Comarcaje de la subunidad $\beta 1$ Na,K-ATPasa, CA125 y DAPI. E) Marcaje con CA125 de otras células a mayor escala. F) Comarcaje de las células del panel anterior. Las flechas en los paneles B, D, E y F indican aquellas células positivas para CA125. La punta de flecha amarilla en el panel F señala zonas granulares de la subunidad $\beta 1$ de Na,K-ATPasa en el interior celular. Escala gráfica: 20 μ m

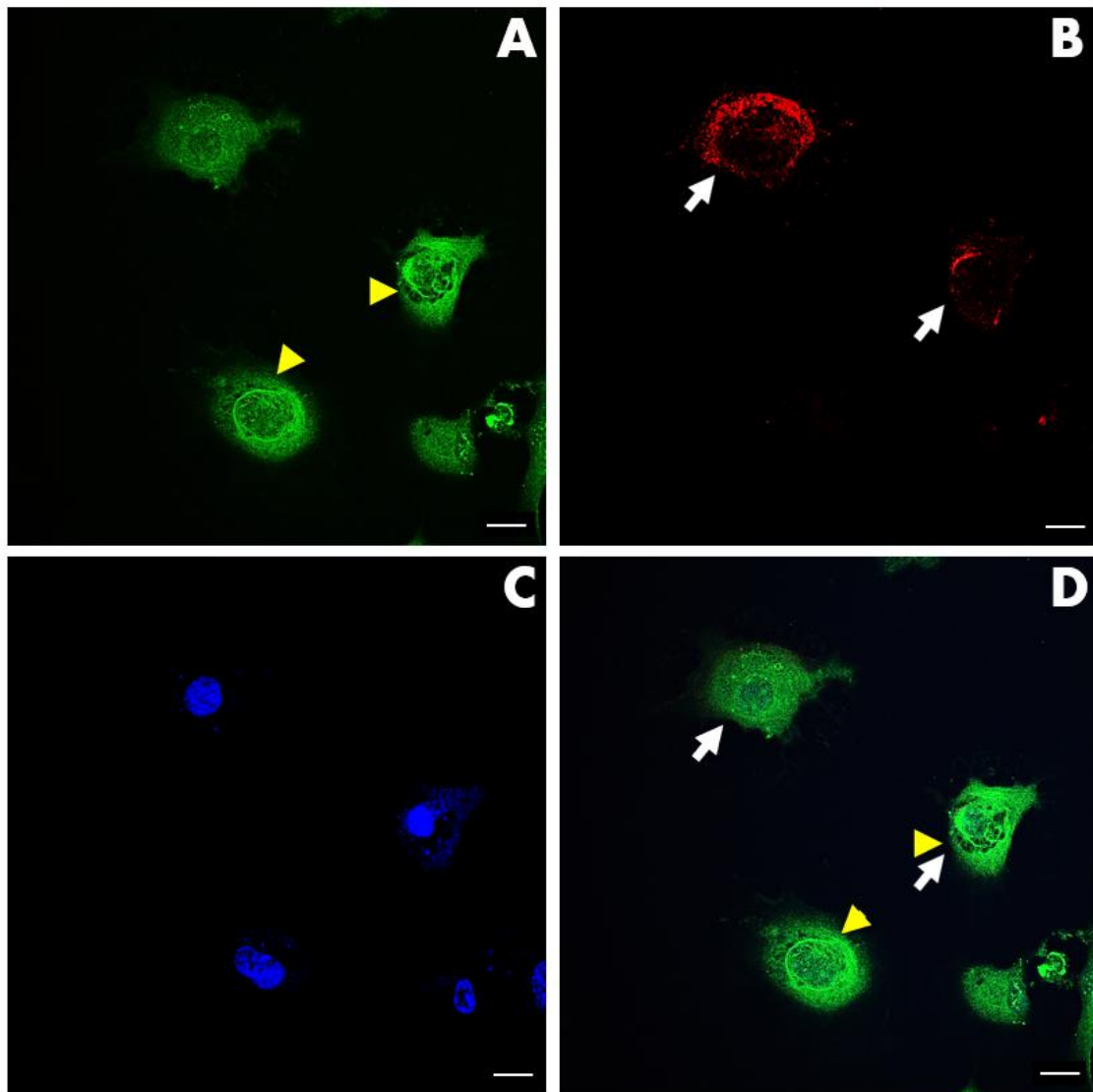


Figura 4: Inmunolocalización por fluorescencia de la subunidad $\beta 1$ Na,K-ATPasa en células de fase 2 de ascitis de paciente con cáncer de ovario (paciente 1). A) Inmunofluorescencia de la subunidad $\beta 1$ de Na,K-ATPasa. B) Marcaje con CA125. C) Marcaje con DAPI. D) Comarcaje de la subunidad $\beta 1$ Na,K-ATPasa, CA125 y DAPI. Las flechas en los paneles B y D indican aquellas células positivas para CA125. Las puntas de flechas en los paneles A y D señalan células con la subunidad $\beta 1$ Na,K-ATPasa localizada en la membrana nuclear. Escala gráfica: $20\mu\text{m}$

Paciente 2

En la paciente 2, de forma general, la señal para la subunidad $\beta 1$ de Na,K-ATPasa en las células de ascitis es más abundante que en la paciente 1. Se localizan en la membrana plasmática y la envuelta nuclear [Figura 5 panel A y C]. Además, no se aprecian diferencias notables de inmunolocalización entre el pase 1 y el pase 2, como si se veía en la paciente 1 [Figura 5 y 6, panel A]. Tampoco se ven diferencias de localización de la subunidad $\beta 1$ entre las células CA125⁺ y el otro (u otros) tipo de células.

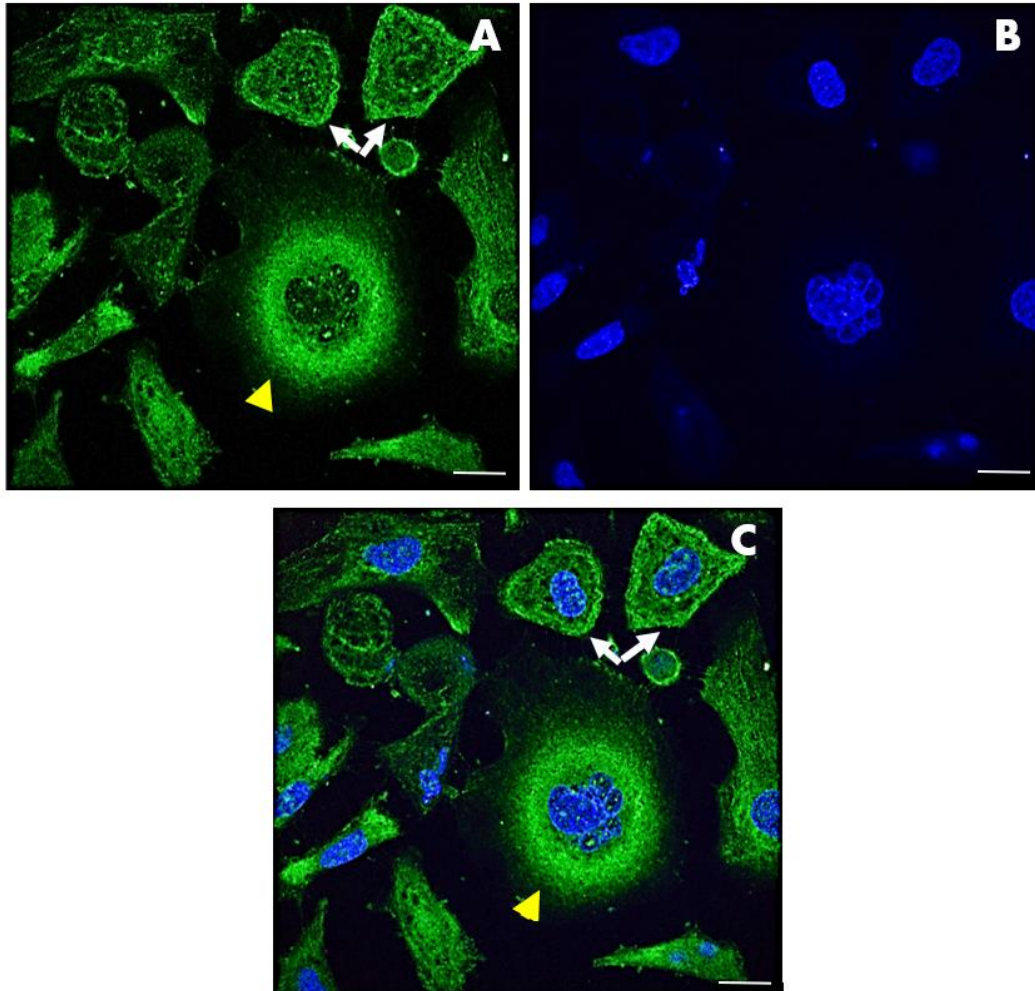


Figura 5: Inmunolocalización por fluorescencia de la subunidad $\beta 1$ Na,K-ATPasa en células de pase 1 de ascitis de paciente con cáncer de ovario (paciente 2). A) Inmunofluorescencia de la subunidad $\beta 1$ de Na,K-ATPasa. B) Marcaje con DAPI. C) Comarcaje de la subunidad $\beta 1$ Na,K-ATPasa, CA125 y DAPI. Las flechas en los paneles A y C indican aquellas células con una distribución de la subunidad $\beta 1$ de Na,K-ATPasa más en la membrana plasmática. La punta de flecha amarilla en el panel A y C señalan una distribución de la subunidad $\beta 1$ de Na,K-ATPasa más en la envoltura nuclear. Escala gráfica 20 μ m.

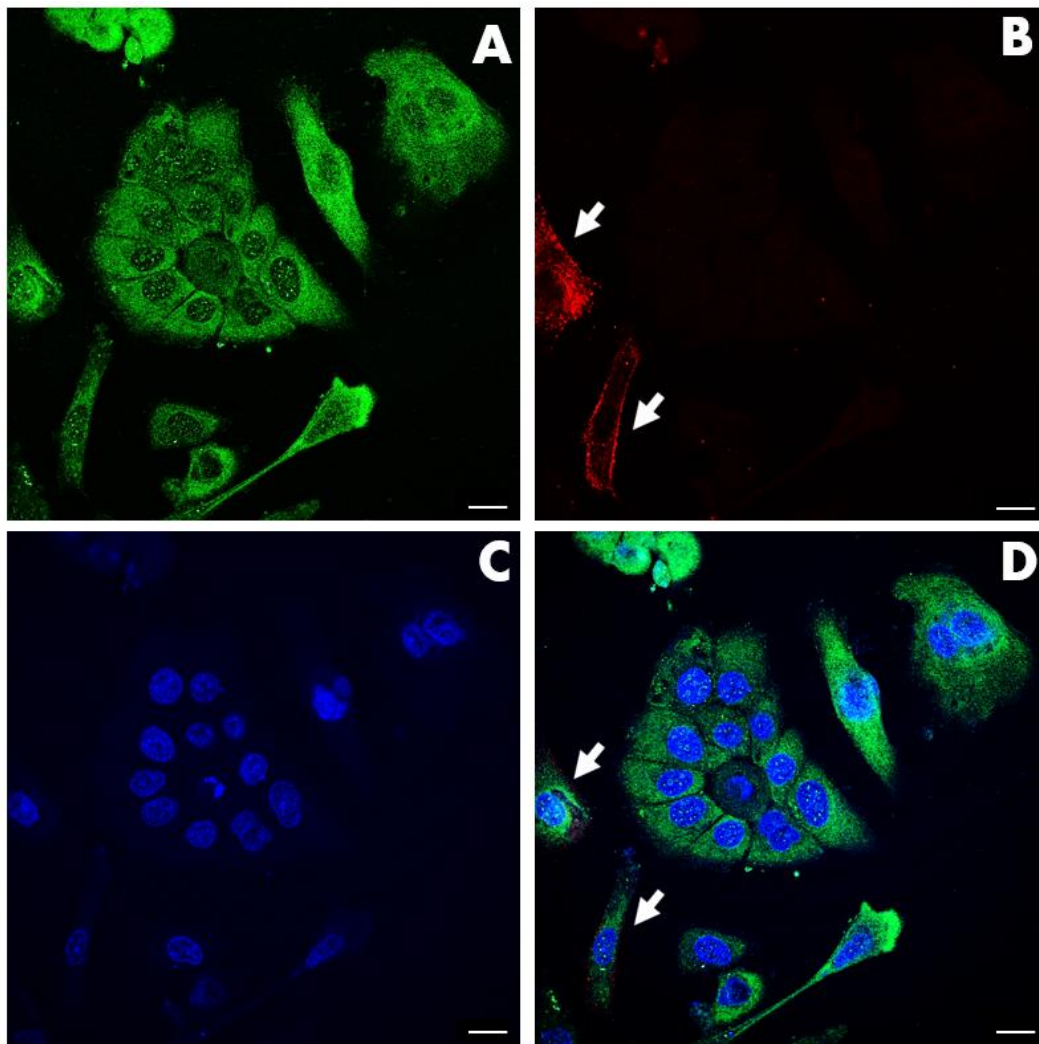


Figura 6: Inmunolocalización por fluorescencia de la subunidad $\beta 1$ Na,K-ATPasa en células de fase 2 de líquido ascítico de paciente con cáncer de ovario (paciente 2). A) Inmunofluorescencia de la subunidad $\beta 1$ de Na,K-ATPasa. B) Marcaje con CA125. C) Marcaje con DAPI. D) Comarcaje para la subunidad $\beta 1$ Na,K-ATPasa, CA125 y DAPI. Las flechas en los paneles B y D indican células positivas para CA125. Escala gráfica: $20\mu\text{m}$.

Inmunolocalización de la subunidad $\beta 2$ de Na,K-ATPasa

Paciente 1

La señal inmunofluorescente para la subunidad $\beta 2$ de Na,K-ATPasa se observa en la célula con un patrón de puntos verdes. La distribución es más o menos homogénea en el citoplasma, se encuentra en gran cantidad en la envoltura nuclear y la membrana plasmática. Además, se detecta la presencia de gránulos como una acumulación de estos en el citoplasma [Figura 7, panel A y D] y determinados lugares en la membrana plasmática [Figura 7, panel F].

En el pase 2, la localización de la subunidad $\beta 2$ de Na,K-ATPasa se encuentra principalmente sobre la envoltura nuclear, sin señal en la membrana plasmática y menos señal en el citoplasma [Figura 8, panel A y D].

No se observan diferencias considerables en cuanto a la subunidad $\beta 2$ entre aquellas células marcadas con CA125 y las que no lo están.

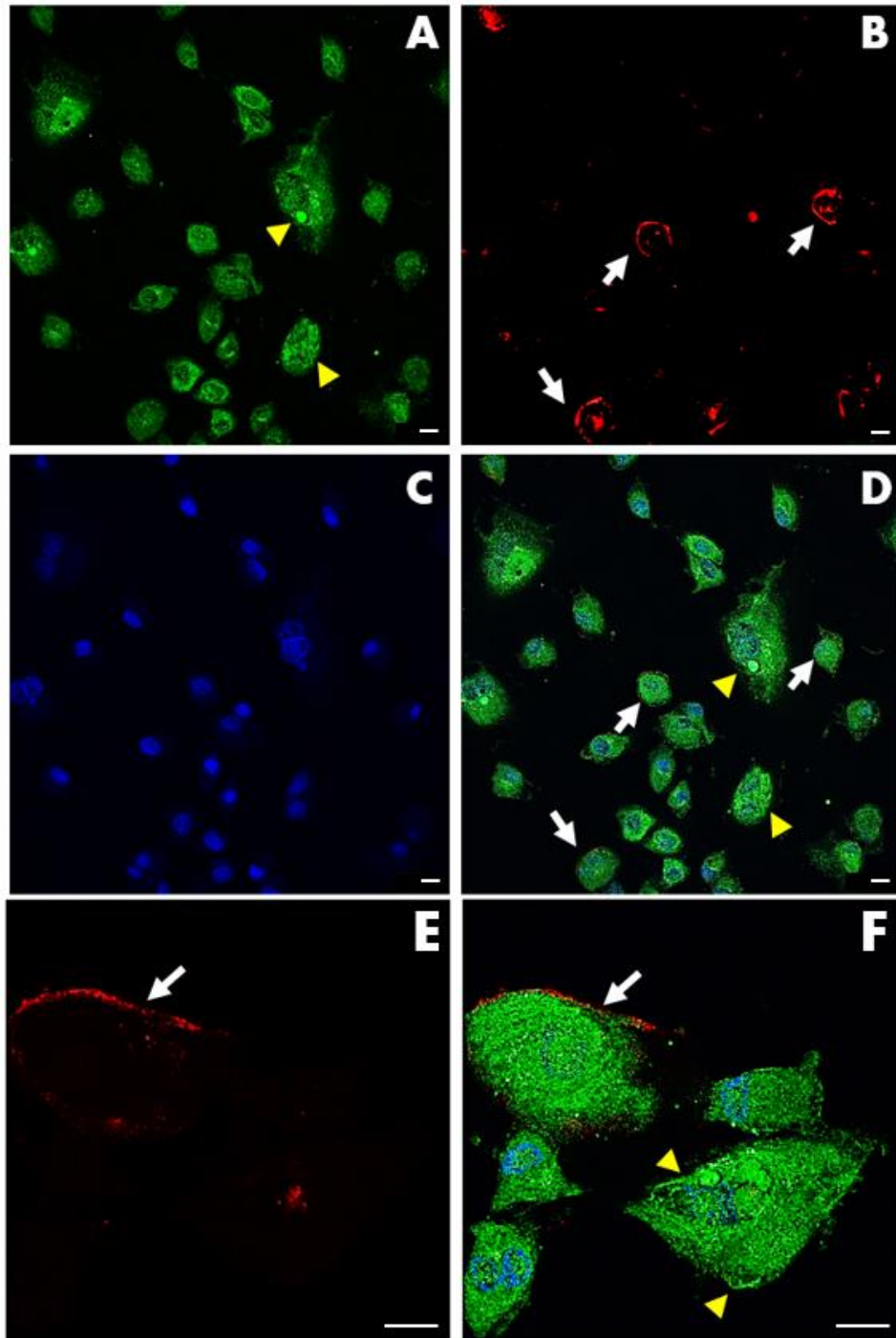


Figura 7: Inmunolocalización por fluorescencia de la subunidad $\beta 2$ de Na,K-ATPasa en células de pase 1 de ascitis de paciente con cáncer de ovario (paciente 1). A) Inmunofluorescencia de la subunidad $\beta 2$ de Na,K-ATPasa. B) Marcaje con CA125. C) Marcaje con DAPI. D) Comarcaje de la

subunidad $\beta 2$ Na,K-ATPasa, CA125 y DAPI. E) Marcaje con CA125 de otras células a mayor escala. F) Comarcaje de las células del panel anterior. Las flechas en los paneles B, D, E y F indican aquellas células positivas para CA125. Las puntas de flechas amarillas en los paneles A y D señalan células con una distribución de la subunidad $\beta 2$ de Na,K-ATPasa más granular. Las puntas de flechas amarillas en el panel F señalan zonas de membrana celular con mayor acumulación de la subunidad $\beta 2$ de Na,K-ATPasa. Escala gráfica: 20 μ m.

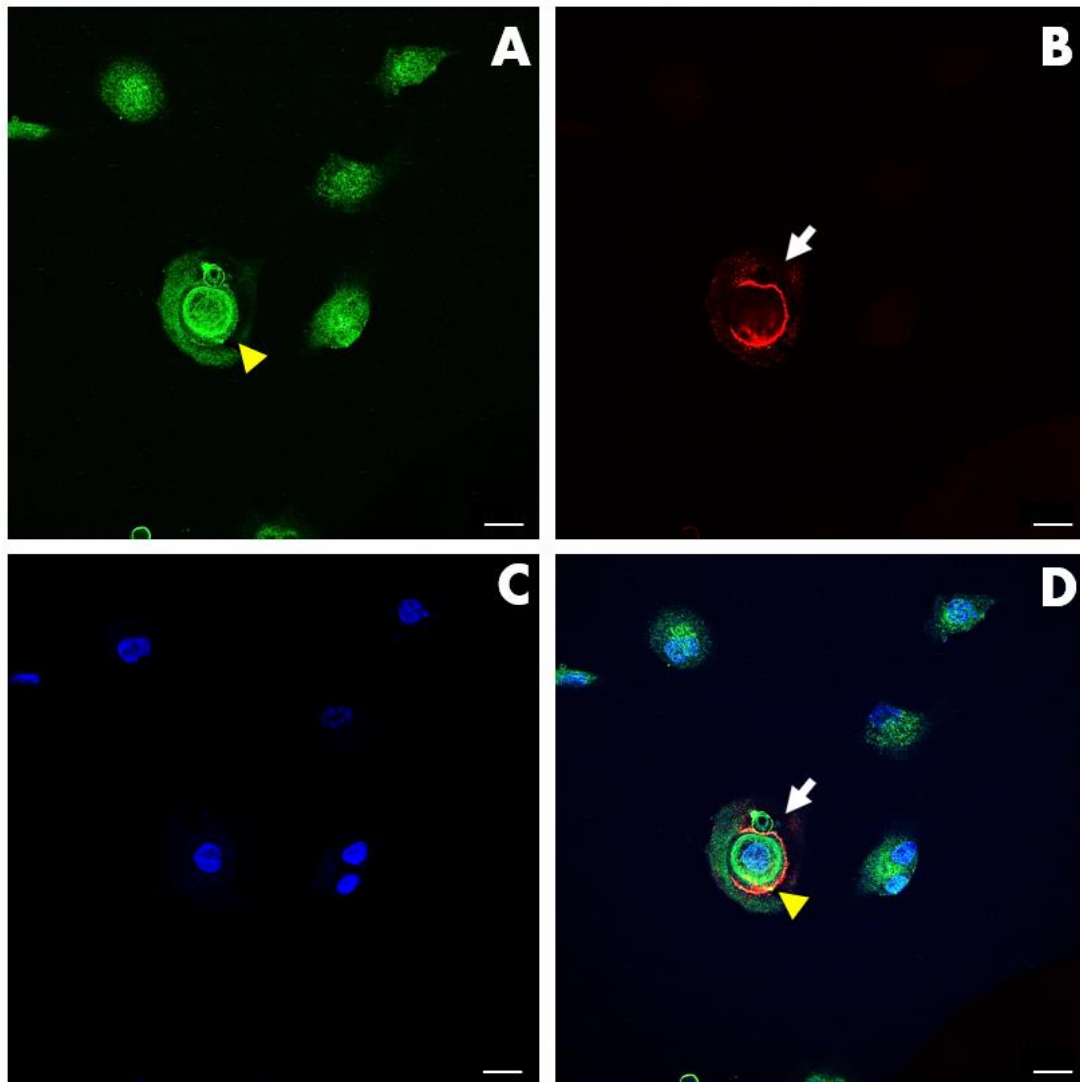


Figura 8: Inmunolocalización por fluorescencia de la subunidad $\beta 2$ Na,K-ATPasa en células de pase 2 de ascitis de paciente con cáncer de ovario (paciente 1). A) Inmunofluorescencia de la subunidad $\beta 2$ de Na,K-ATPasa. B) Marcaje con CA125. C) Marcaje con DAPI. D) Comarcaje de la subunidad $\beta 2$ Na,K-ATPasa, CA125 y DAPI. La flecha en los paneles B y D indica la célula positiva para CA125. La punta de flecha amarilla en los paneles A y D señala célula con una localización clara de la subunidad $\beta 2$ de Na,K-ATPasa en la envoltura nuclear. Escala gráfica: 20 μ m

Paciente 2

En la paciente 2, de forma general, la señal para la subunidad $\beta 2$ de Na,K-ATPasa es más abundante que en la paciente 1 [Figura 9, panel A] aunque la localización es igual. Por otro lado, la distribución en el pase 1 y en el pase 2 sigue siendo mayoritaria en las membranas plasmática y nuclear y en el citoplasma, sin variación apreciable entre pase y pase. [Figuras 9 y 10, panel A].

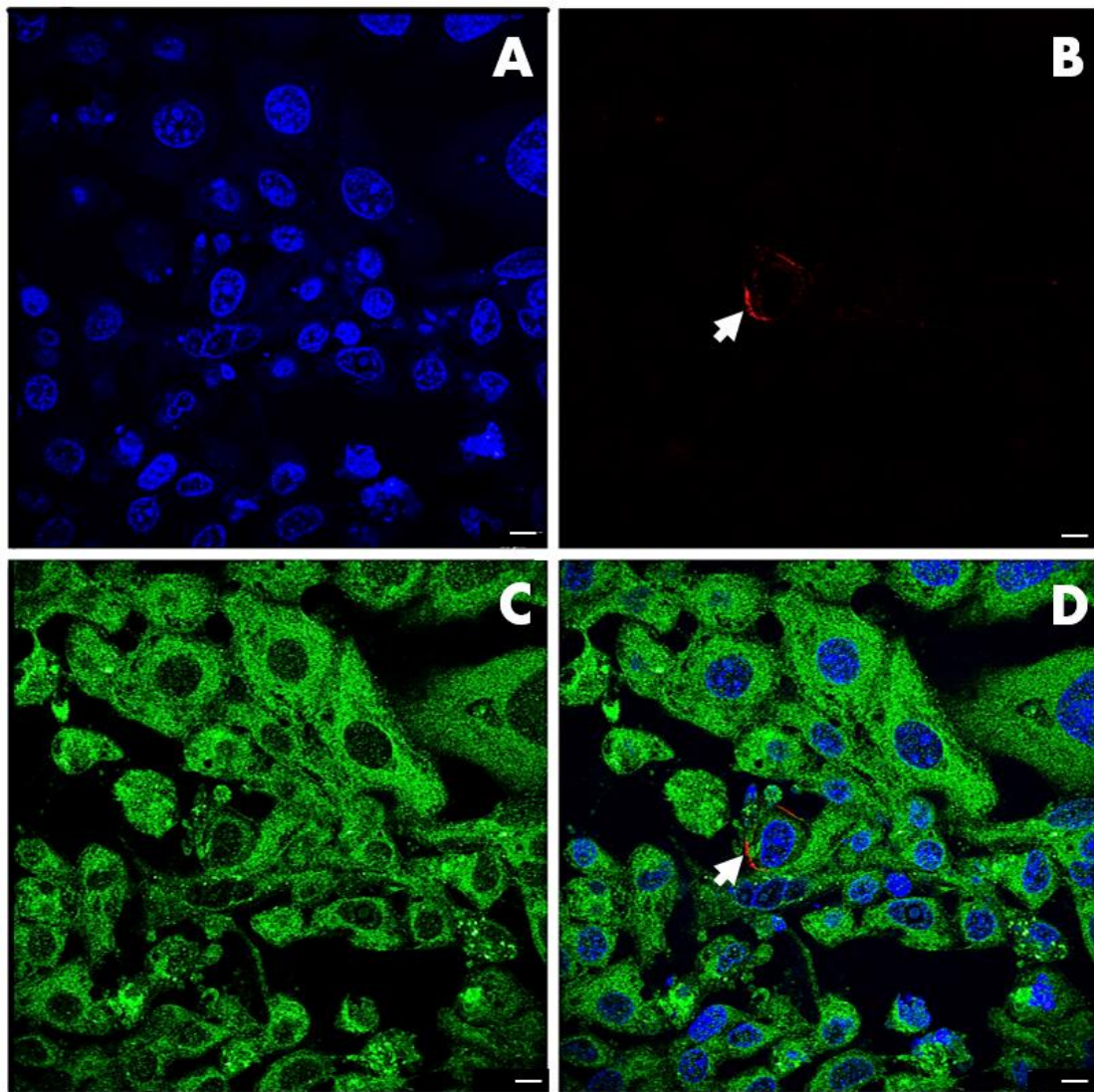


Figura 9: Inmunolocalización por fluorescencia de la subunidad $\beta 2$ de Na,K-ATPasa en células de pase 1 procedentes de líquido ascítico de pacientes con cáncer de ovario (paciente 2). A) Inmunofluorescencia de la subunidad $\beta 2$ de Na,K-ATPasa. B) Marcaje con CA125. C) Marcaje con DAPI. D) Comarcaje de la subunidad $\beta 2$ de Na,K-ATPasa, CA125 y DAPI. La flecha en los paneles B y D indican la célula positiva para CA125. Escala gráfica: 20 μ m

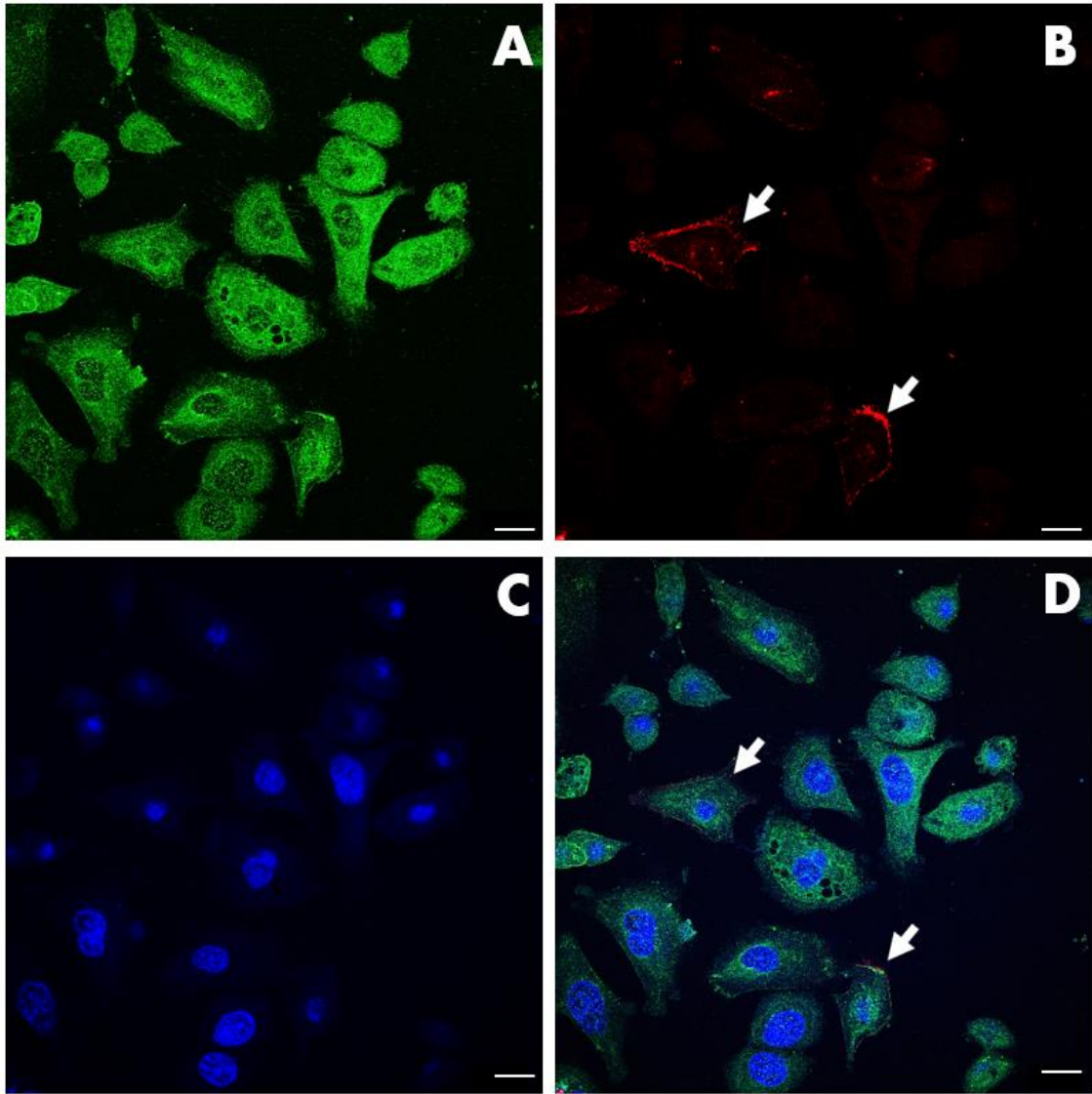


Figura 10: Inmunolocalización por fluorescencia de la subunidad $\beta 2$ de Na,K-ATPasa en células de fase 2 en paciente con cáncer de ovario (paciente 2). A) Inmunofluorescencia de la subunidad $\beta 2$ de Na,K-ATPasa. B) Marcaje con CA125. C) Marcaje con DAPI. D) Comarcaje de la subunidad $\beta 2$ Na,K-ATPasa, CA125 y DAPI. Las flechas en los paneles B y D indican las células positivas para CA125. Escala gráfica: 20 μ m

Expresión de las isoformas $\beta 1$ y $\beta 2$ de Na,K-ATPasa

La tabla 3 resume los niveles de expresión de las isoformas de β Na,K-ATPasa de estudio y sus localizaciones.

		Subunidad $\beta 1$ de Na,K-ATPasa	Subunidad $\beta 2$ de Na,K-ATPasa
Paciente 1	Pase 1	++ m, n, c	++ m, n, c
	Pase 2	+ n, c	+ n, c
Paciente 2	Pase 1	+++ m, n, c	+++ m, n, c
	Pase 2	+++ m, n, c	+++ m, n, c

Tabla 2: Niveles de expresión deducidos por inmunolocalización de las isoformas de la subunidad β de Na,K-ATPasa en paciente 1 y 2 y sus respectivos pases. Sin expresión (-), baja expresión (+), expresión moderada (++) , alta expresión (+++). Membrana plasmática (m), membrana nuclear (n), citoplasma (c).

Discusión

De la metodología empleada

Método estadístico

En este estudio se han empleado métodos básicos de porcentajes para calcular el número de células CA125⁺ entre el total de células. También se ha realizado estadística cualitativa para expresar la proporción de isoformas 1 y 2 de la subunidad β de Na,K-ATPasa en las células, corroborada, al menos, por dos observadores independientes.

Aislamiento y cultivo de células

El líquido ascítico maligno está formado por un gran número de células, las cuales muchas son desprendidas del tejido tumoral y, por tanto, podrían ser células tumorales malignas, aunque también células del estroma tumoral o inflamatorias (Matte et al., 2015). Se escogió el proceso de aislamiento de células de líquido ascítico para poder analizar las células tumorales contenidas en el mismo. Además, nos pareció un método fácil y rápido para establecer una línea en lugar de otros métodos en los que hay que disgregar el tejido tumoral.

Para separarlas del resto de células no tumorales se realizaron los cultivos celulares con la idea de que las células no tumorales se irían muriendo mientras que las cancerígenas permanecen en el cultivo.

Inmunohistoquímica

Para este estudio se consideró la inmunohistoquímica como el mejor método para realizar los objetivos. A diferencia de otros métodos, permite no solo ver la presencia de la proteína de análisis en la célula, sino también su localización y con ello poder discutir sus posibles implicaciones funcionales. También se consideró su mayor sensibilidad, célula a célula, y la posibilidad del estudio simultáneo de expresión de varios genes mediante dobles o triples marcajes. La potencia de la resolución óptica de la microscopía confocal fue otro factor para elegir este método.

Los anticuerpos primarios para CA125 y secundarios anti mouse y anti rabbit que se emplearon fueron los del mercado y mostraron ser específicos y de una nitidez de imagen de muy alta calidad. Los anticuerpos usados para subunidad $\beta 1$ de Na,K-ATPasa y subunidad $\beta 2$ de Na,K-ATPasa fueron de desarrollo y producción del Laboratorio de Biología de Desarrollo,

estos son de gran especificidad aportando una calidad de imagen muy alta, siendo usados en múltiples publicaciones propias y de otros. A modo general, se han escogido estos anticuerpos pues han sido utilizados ampliamente en este y otros laboratorios, obteniendo resultados muy satisfactorios.

De los resultados obtenidos

Expresión de CA125

Según hemos visto en las imágenes obtenidas de inmunohistoquímica descritas anteriormente, CA125 se localiza en la membrana plasmática. Las células CA125⁺ se consideran células de ovario tumorales. Los anticuerpos contra CA125 son, hoy en día, el marcaje más empleado para diagnosticar con especificidad el cáncer de ovario. Esta proteína aumenta su expresión notablemente en aquellas células tumorales de ovario y se ha comprobado que al silenciar el gen que la traduce (MUC16) las células pierden su capacidad de adhesión, migración e invasión (Reinartz, Failer, Schuell, & Wagner, 2011). Otros estudios afirman que la presencia de ascitis aumenta CA125 en las pacientes con cáncer de ovario (Bergmann et al., 1987).

Se produce un crecimiento del 10% de células CA125⁺ en el pase 2 (dos semanas de diferencia entre los dos pases). Este aumento del número de células tumorales de ovario se puede asociar a su alta capacidad de proliferación y su inmortalidad en detrimento del resto de células que van muriendo (Greider, 1998). Muy posiblemente seguirían este ascenso si se continuara el cultivo.

Una diferencia esencial en nuestro estudio es el número de células CA125⁺ de las pacientes 1 y 2. Hay más células tumorales ováricas en la paciente 1 que en la 2, una diferencia de aproximadamente el 20%. Esto es a causa del tipo de cáncer de ovario que presentan. Ambas sufren carcinoma seroso de alto grado, sin embargo, en la paciente 1 es de origen ovárico (estadio IIIC) mientras que en la paciente 2 es de origen peritoneal (estadio IIIC). Al ser de orígenes distintos las células tumorales que predominan en el líquido son también distintas, en el cáncer de origen de ovárico se encuentran células cancerígenas procedentes del ovario; en el cáncer de origen peritoneal van a predominar las células tumorales del peritoneo antes que las de ovario. Esto hace considerar que en los cultivos existen más de un tipo de célula. Además, en las dos pacientes las células CA125⁺ no superan ni un tercio del

total de células en el pase 2, lo que implica que el resto de las células no son tumorales de ovario. Estas células pueden ser células normales que hayan sobrevivido a los pases o células tumorales, pero no de ovario.

Expresión de la subunidad $\beta 1$ de Na,K-ATPasa y $\beta 2$

A modo general, ambas isoformas presentan una localización aparente similar, aunque con variaciones en su nivel de expresión que comentaremos más adelante. La Na,K-ATPasa se encuentra altamente expresada en las células epiteliales (Shoshani et al., 2005). En el líquido ascítico, el tipo de células que se encuentran son epiteliales, ya sean mesoteliales procedentes de la cavidad abdominal, del propio ovario o del tumor (Matte et al., 2015).

Las dos isoformas se localizan en la membrana celular, nuclear y aparentemente soluble en el citoplasma, lo que coincide con la distribución que se da en células normales epiteliales (Shoshani et al., 2005). Encontrarlas embebidas en la bicapa lipídica es una de sus localizaciones cuantitativamente más abundantes, debido a su función principal, el transporte de sodio y potasio. Otro factor por el que se relaciona con la membrana es el reciente descubrimiento de la subunidad β con los contactos celulares. Existe interacción entre las β de las Na,K-ATPasa de las células vecinas ayudando a establecer relación (Cereijido, Contreras, Shoshani, & Larre, 2012). Por otro lado, los dominios citoplasmáticos de Na,K-ATPasa $\alpha 1$ y de E-cadherinas parecen estar unidos a la actina del citoesqueleto por medio de la proteína anquirina (Zhang, Devarajan, Dorfman, & Morrow, 1998) y esta unión está favorecida por la subunidad β , pues en ausencia se pierde las uniones entre ambas proteínas y se da un descenso de la interacción celular (Cereijido et al., 2012).

El aspecto punteado que se aprecia en las imágenes de inmunohistoquímica de las dos isoformas se puede relacionar con las balsas lipídicas. Estas están formadas por colesterol, esfingolípidos, fosfolípidos saturados y proteínas de membrana. Pueden tener funciones de plataforma para el transporte de membrana, señalización y polarización (Rajendran & Simons, 2005).

La principal diferencia de expresión la encontramos en la paciente 1, en la que se produce una reducción a lo largo del tiempo de las dos isoformas β de la Na,K-ATPasa, descendiendo principalmente en la membrana plasmática. Este hecho puede relacionarse con la tumorigénesis y la progresión tumoral, en este caso, en el cáncer de ovario. Existen estudios que comprueban como en células cancerígenas se produce la pérdida de la subunidad β (Inge

et al., 2008), lo que podría favorecer a la pérdida de la polaridad, a la migración celular y a la proliferación. Al tratarse de células, la mayoría, epiteliales, la pérdida de polaridad confiere a la célula otra morfología más mesenquimal (sin parte basal ni apical), esto se conoce como Transición Epitelio Mesenquimal (EMT). Aún se desconoce el factor que provoca este proceso en cáncer de ovario, pero en carcinoma de células renales es común la metilación del gen ATP1B1 para $\beta 1$ y como consecuencia la EMT (Selvakumar et al., 2014). Además, en pacientes con glioblastoma los astrocitos secundarios presentan una menor expresión de $\beta 2$, predominante en este tipo de células (Rotoli et al., 2017). La baja expresión de β hace que disminuya los contactos entre las células vecinas (menos interacciones entre β Na,K-ATPasa) y, en caso de ser células cancerígenas, favorecen al proceso de metástasis (Lengyel, 2010).

En células madres mesenquimales aisladas de tejido adiposo, nuestro grupo ha evidenciado expresión de la isoforma $\beta 2$ (Acosta, Avila, Mobasheri, & Martin-Vasallo, 2011), una isoforma predominantemente expresada en astrocitos en el sistema nervioso central y nunca en adipocitos, por ello, se podía considerar que las células de estudio están mostrando un grado de desdiferenciación.

A diferencia de la paciente 1, en la paciente 2 la expresión de las dos isoformas no disminuye con el número de pases, lo que podría indicar un linaje distinto aunque, clínicamente, la presentación del tumor es similar. Además, de forma general, la expresión es mayor en las células de la paciente 2 que en las de la paciente 1. Las células aisladas de la paciente 1 estuvieron en cultivo 2 semanas más (necesitaron estar) en el pase 1 que las de la paciente 2. Esta diferencia de tiempo indica que las células de la paciente 1 tienen características de crecimiento distintas y que, además, presentan una más baja expresión de subunidad β de Na,K-ATPasa. El distinto origen del cáncer de ovario puede ser también un factor de influencia en este hecho, hay estudios que afirman que dependiendo del tipo de carcinoma existe una mayor o menor reducción de la expresión de subunidad β de Na,K-ATPasa (Espineda et al., 2003; Inge et al., 2008). Sin embargo, no se considera el distinto estadio del cáncer como otro factor pues si fuera así ambas pacientes tendrían la misma expresión.

De los resultados tomados de su conjunto

Los patrones de expresión de las isoformas $\beta 1$ y $\beta 2$ de Na,K-ATPasa muestran similitud entre las células CA125⁺ y las negativas, con variaciones asociadas al origen tumoral y al tipo de célula.

En la paciente 1 se podría suponer que la mayoría de las células analizadas son cancerígenas a pesar de no estar marcadas con CA125 (solo marca las de ovario tumorales) pues en una gran proporción de células se observa una reducción de la expresión con los pases, algo que habíamos afirmado como característico de células tumorales. Puede ser debido a que, cuando se aislaron las células, en el líquido estaban abundando las células tumorales. La ascitis maligna se considera como un factor para convertir células normales en cancerígenas. Las células del mesotelio peritoneal pueden secretar ácido lisofosfatídico, el cual es un regulador lipídico y parece que estimula la migración de las células tumorales (Ren et al., 2006). También se han encontrado otros factores (dipeptidil peptidasa IV y el factor de crecimiento vascular endotelial) que por acción de la ascitis maligna son liberados en mayores cantidades por las células del mesotelio peritoneal y que pueden favorecer a la proliferación (Stadlmann et al., 2005). Desde el punto de vista fenomenológico, otra posible explicación para que solo se observe la expresión de células cancerígenas es que ya durante los primeros días del cultivo se murieron gran parte de las células no tumorales.

En la paciente 2 no podemos afirmar que la mayoría sean cancerígenas pues no hay reducción de expresión de las isoformas ni en CA125⁺ ni en las negativas y por tanto estas últimas pueden ser células tumorales o no. Solo CA125⁺ podemos confirmar que son cancerígenas.

Por otro lado, como ya hemos comentado, las imágenes en patrón de puntos que se han presentado, en contraposición en las delineadas a “punta de lápiz” que aparecen en otros tipos de células, pueden indicar una distribución de estas isoformas en este tipo celular asociada a balsas lipídicas, como balsas de colesterol, en las que la asociación con otras proteínas podría sugerir un papel como proteínas “moonlighting”. En este estudio no podemos confirmar tal hipótesis, pero si es un comienzo para una futura investigación.

El establecimiento y caracterización de estas células, sin duda, nos servirán de base para un mejor conocimiento de este tumor, y este estudio es un preliminar para ello.

Conclusiones

1. Dentro de los márgenes estadísticos de nuestra muestra, en células aisladas de líquido ascítico de pacientes con cáncer de ovario, la identificación con CA125⁺ nos indicó que las células tumorales de ovario varían entre un 15 y un 30% del total de las células. El porcentaje se incrementa con los pases.
2. Las isoformas $\beta 1$ y $\beta 2$ de la Na,K-ATPasa se inmunolocalizan en la membrana plasmática, envuelta nuclear y como forma aparentemente soluble en citoplasma. El hecho de estar dispuesta por todo el entorno de la membrana plasmática nos sugiere una pérdida de polaridad, producto de la EMT.
3. Los niveles de expresión de las isoformas β son distintos según el presunto origen tumoral:
 - a. En la paciente 1 (cáncer de origen ovárico) se produce una reducción de la expresión de ambas isoformas con los pases.
 - b. En la paciente 2 (cáncer de ovario con origen aparentemente peritoneal) no hay variación de expresión entre pases.
4. El patrón de puntos en la localización de las isoformas $\beta 1$ y $\beta 2$ de Na,K-ATPasa sugieren una distribución asociada a balsas lipídicas indicando un posible papel "moonlighting".

Conclusions

1. Within our statistical limits, in cells isolated from ascitic fluid of patients suffering from ovarian cancer, the identification with CA125⁺ marker showed that ovarian tumour cells arrange between 15 and 30% of the total of the cells. The percentage increases along to cell passages.
2. Na, K-ATPase $\beta 1$ and $\beta 2$ isoforms immunolocalize in the plasma membrane, nuclear envelope and, in an apparent soluble form, in the cytoplasm. The fact of being in all plasma membrane suggests a loss of polarity, cause for EMT.
3. Na, K-ATPase $\beta 1$ and $\beta 2$ isoforms expression levels are different according to the state of tumour origin:
 - a. In patient 1 (cancer of ovarian origin) expression of both isoforms is reduced with the passages.
 - b. In patient 2 (ovarian cancer of apparent peritoneal origin) there is no variation between passages.
4. The pattern in "dots" of Na, K-ATP $\beta 1$ and $\beta 2$ isoforms location suggest a distribution associated with lipid rafts indicating a possible "moonlighting" role.

Bibliografía

- Acosta, E., Avila, J., Mobasheri, A., & Martin-Vasallo, P. (2011). Na⁺, K⁺-ATPase genes are down-regulated during adipose stem cell differentiation. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 3, 1229–1240.
- Alsop, K., Fereday, S., & Meldrum, C. (2012). BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation–positive women with ovarian cancer: a report from the Australian Ovarian Cancer Study Group. *Journal of Clinical Oncology*, 30(21), 2654.
- Balasubramaniam, S. L., Gopalakrishnapillai, A., & Barwe, S. P. (2015). Ion dependence of Na-K-ATPase-mediated epithelial cell adhesion and migration. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 309(6), C437–C441.
- Bergmann, J., Bidart, J., George, M., Beaugrand, M., Levy, V. G., & Bohuon, C. (1987). Elevation of CA 125 in patients with benign and malignant ascites. *Cancer*, 59(2), 213–217.
- Cereijido, M., Contreras, R. G., Shoshani, L., & Larre, I. (2012). The Na⁺-K⁺-ATPase as self-adhesion molecule and hormone receptor. *AJP: Cell Physiology*, 302(3), C473–C481. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00083.2011>
- Espineda, C., Seligson, D. B., James Ball, W., Rao, J., Palotie, A., Horvath, S., ... Rajasekaran, A. K. (2003). Analysis of the Na, K-ATPase α - and β -subunit expression profiles of bladder cancer using tissue microarrays. *Cancer*, 97(8), 1859–1868.
- Greider, C. W. (1998). Telomerase activity, cell proliferation, and cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(1), 90–92.
- Hamilton, W., Peters, T. J., Bankhead, C., & Sharp, D. (2009). Risk of ovarian cancer in women with symptoms in primary care: population based case-control study. *Bmj*, 339, b2998.
- Hassan, R., Remaley, A. T., Sampson, M. L., Zhang, J., Cox, D. D., Pingpank, J., ... Onda, M. (2006). Detection and quantitation of serum mesothelin, a tumor marker for patients with mesothelioma and ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*, 12(2), 447–453. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1477>
- Inge, L. J., Rajasekaran, S. a, Yoshimoto, K., Mischel, P. S., McBride, W., Landaw, E., & Rajasekaran, a K. (2008). Evidence for a potential tumor suppressor role for the Na,K-ATPase beta1-subunit. *Histology and Histopathology*, 23(4), 459–467. <https://doi.org/10.14670/HH-23.459>
- Jorgensen, P. L., Håkansson, K. O., & Karlsh, S. J. D. (2003). Structure and mechanism of Na, K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annual Review of Physiology*, 65(1), 817–849.
- Kipps, E., Tan, D. S. P., & Kaye, S. B. (2013). Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. *Nature Reviews Cancer*, 13(4), 273.
- Kravtsova, V. V, Matchkov, V. V, Bouzinova, E. V, Vasiliev, A. N., Razgovorova, I. A., Heiny, J. A., & Krivoi, I. I. (2015). Isoform-specific Na, K-ATPase alterations precede disuse-induced atrophy of rat soleus muscle. *BioMed Research International*, 2015.
- Ledermann, J. A., Raja, F. A., Fotopoulou, C., Gonzalez-Martin, A., Colombo, N., Sessa, C., & Group, E. G. W. (2013). Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 24(suppl_6), vi24-vi32.
- Lengyel, E. (2010). Ovarian cancer development and metastasis. *The American Journal of Pathology*, 177(3), 1053–1064.
- Matte, I., Lane, D., Laplante, C., Garde-Granger, P., Rancourt, C., & Piché, A. (2015). Ovarian cancer ascites enhance the migration of patient-derived peritoneal mesothelial cells via cMet pathway through HGF-dependent and-independent mechanisms. *International Journal of Cancer*, 137(2), 289–298.
- Mobasheri, A., Avila, J., Cózar-Castellano, I., Brownleader, M. D., Trevan, M., Francis, M. J. O., ... Martín-Vasallo, P. (2000). Na⁺,K⁺ -ATPase Isozyme Diversity; Comparative Biochemistry and Physiological Implications of Novel Functional Interactions. *Bioscience Reports*, 20(2), 51–91. <https://doi.org/10.1023/A:1005580332144>
- Oey, R. C., van Buuren, H. R., & de Man, R. A. (2016). The diagnostic work-up in patients with ascites: current guidelines and future prospects. *The Netherlands Journal of Medicine*, 74(8), 330–335.

- Patankar, M. S., Jing, Y., Morrison, J. C., Belisle, J. A., Lattanzio, F. A., Deng, Y., ... Clark, G. F. (2005). Potent suppression of natural killer cell response mediated by the ovarian tumor marker CA125. *Gynecologic Oncology*, *99*(3), 704–713.
- Rabinovich, G. A., & Rubinstein, N. (2001). Galectinas: una nueva familia de proteínas involucradas en la regulación de la respuesta inmune. Implicancias en procesos inmunopatológicos. *Medicina (Buenos Aires)*, *61*(1), 85–92.
- Rajasekaran, S. A., Palmer, L. G., Quan, K., Harper, J. F., Ball, W. J., Bander, N. H., ... Rajasekaran, A. K. (2001). Na,K-ATPase beta-subunit is required for epithelial polarization, suppression of invasion, and cell motility. *Molecular Biology of the Cell*, *12*(2), 279–295. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.2.279>
- Rajendran, L., & Simons, K. (2005). Lipid rafts and membrane dynamics. *Journal of Cell Science*, *118*(6), 1099–1102.
- Ramos-Vara, J. A. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, *42*(4), 405–426.
- Reinartz, S., Failer, S., Schuell, T., & Wagner, U. (2011). CA125 (MUC16) gene silencing suppresses growth properties of ovarian and breast cancer cells. *European Journal of Cancer*, *48*(10), 1558–1569. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.07.004>
- Ren, J., Xiao, Y., Singh, L. S., Zhao, X., Zhao, Z., Feng, L., ... Xu, Y. (2006). Lysophosphatidic acid is constitutively produced by human peritoneal mesothelial cells and enhances adhesion, migration, and invasion of ovarian cancer cells. *Cancer Research*, *66*(6), 3006–3014.
- Rotoli, D., Cejas, M. M., Maeso, M. del C., Pérez-Rodríguez, N. D., Morales, M., Ávila, J., ... Martín-Vasallo, P. (2017). The Na, K-ATPase β -subunit isoforms expression in glioblastoma multiforme: Moonlighting roles. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(11). <https://doi.org/10.3390/ijms18112369>
- Saldova, R., Struwe, W. B., Wynne, K., Elia, G., Duffy, M. J., & Rudd, P. M. (2013). Exploring the glycosylation of serum CA125. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(8), 15636–15654. <https://doi.org/10.3390/ijms140815636>
- Scully, R. E., Scully, R., Sobin, L. H., & Serov, S. F. (1999). *Histological typing of ovarian tumours* (Vol. 9). Springer Science & Business Media.
- Selvakumar, P., Owens, T. A., David, J. M., Petrelli, N. J., Christensen, B. C., Lakshmikuttyamma, A., & Rajasekaran, A. K. (2014). Epigenetic silencing of Na,K-ATPase β 1 subunit gene *ATP1B1* by methylation in clear cell renal cell carcinoma. *Epigenetics*, *9*(4), 579–586. <https://doi.org/10.4161/epi.27795>
- Shoshani, L., Contreras, R. G., Roldán, M. L., Moreno, J., Lázaro, A., Balda, M. S., ... Cerejido, M. (2005). The polarized expression of Na⁺, K⁺-ATPase in epithelia depends on the association between β -subunits located in neighboring cells. *Molecular Biology of the Cell*, *16*(3), 1071–1081.
- Simons, K., & Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *1*(1), 31.
- Stadlmann, S., Amberger, A., Pollheimer, J., Gastl, G., Offner, F. A., Margreiter, R., & Zeimet, A. G. (2005). Ovarian carcinoma cells and IL-1 β -activated human peritoneal mesothelial cells are possible sources of vascular endothelial growth factor in inflammatory and malignant peritoneal effusions. *Gynecologic Oncology*, *97*(3), 784–789.
- Therien, A. G., & Blostein, R. (2000). Mechanisms of sodium pump regulation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *279*(3), C541–C566.
- Weiland, F., Martin, K., Oehler, M. K., & Hoffmann, P. (2012). Deciphering the molecular nature of ovarian cancer biomarker CA125. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(8), 10568–10582. <https://doi.org/10.3390/ijms130810568>
- Zhang, Z., Devarajan, P., Dorfman, A. L., & Morrow, J. S. (1998). Structure of the ankyrin-binding domain of α -Na, K-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(30), 18681–18684.

