



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**“EXPRESIÓN DE RECEPTORES PURINÉRGICOS  
DURANTE LA FOLICULOGÉNESIS EN MAMÍFEROS”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL  
GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS  
(NEUROBIOLOGÍA)**

**PRESENTA**

**Q.F.B. ANNA BERENICE JUÁREZ ESPINOSA**

**DIRECTORES DE TESIS:**  
Dr. Rogelio Arellano Ostoa  
Dra. Teresa Edith Garay Rojas

**Juriquilla-Querétaro, 2006**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rogelio Arellano y a la Dra. Edith Garay, por su apoyo invaluable en mi formación profesional, su apoyo, su confianza y su amistad.

A mi comité tutorial: Dra. Carmen Clapp y Dra. Aurea Orozco por sus comentarios, críticas y guía sobre la elaboración de esta tesis.

A los miembros del jurado: Dra. Ma. del Carmen Clapp Jiménez L., Dr. Enrique Pedernera Astegiano y Dra. Marisela Luna Muñoz, por sus sugerencias en la revisión de este trabajo

Agradezco a la Dra. Carmen Clapp y al M en C Fernando López, por permitirme utilizar la infraestructura de su laboratorio y su apoyo incondicional.

A la Biblioteca (Lic. Ma. Del Pilar Galarza Barrios), Bioterio (MZV Martín García Servín) y Unidad de Computo (ISC Omar González Hernández), por su colaboración durante la realización de este trabajo.

A Leonor Casanova, a quien agradezco su apoyo en el área administrativa. Además del reconocimiento a la eficiencia con la que realiza su trabajo.

A Isabel y Yolanda, quienes nos facilitan gran parte del trabajo.

A mis hermanos (Jetza, Erwin y Lucero) por su amor y apoyo incondicional.

Al Dr. Rafael Sánchez Usabiaga (Médica Fértil), a quien reitero un gran agradecimiento por el apoyo recibido en el inicio de mis estudios de posgrado.

A mis compañeros del laboratorio: Gisela R, Carlos S y Luis R, tanto por su apoyo en mi formación, así como por su amistad.

A Horacio Leyva, por su amistad y gran ayuda en la realización de este trabajo.

A mis compañeros: Ariel, Argel, Lorena, Nancy, Salvador y Ulises: por todos los momentos valiosos de amistad y de compañerismo.

A mis padres:  
Elías y Dina por su amor, confianza y respeto a mis decisiones.  
Gracias por abrirme las puertas al tesoro máspreciado...el conocimiento.

A Paco:  
Gracias por acompañarme en el camino de mis anhelos, de mis risas  
y de mis tristezas.

“¡Que alegría comprender! Me siento inteligente. Creía que estas nociones estaban muy por encima de mi capacidad intelectual.” Los divulgadores científicos escuchan con frecuencia estas frases. Señalan, a mi entender, una grave deficiencia de nuestros sistemas educativos.

En vez de despertar las ganas de aprender y acrecentar la aptitud para pensar, las instituciones, con demasiada frecuencia, privan a los estudiantes del placer del conocimiento e inyectan, de propina, un sentimiento de incompetencia.

Los daños de la escuela no son (necesariamente) irreparables. Devolver la confianza, resucitar el gusto de aprender, el placer de conocer es, ciertamente, una de las más altas misiones de la divulgación científica.

*H. Reeves*  
*La Hora de Embriagarse*  
*¿Tiene sentido el universo?*

<b>INDICE.....</b>	<b>i</b>
<b>INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....</b>	<b>iii</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>v</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>vi</b>
<b><u>I. INTRODUCCIÓN.....</u></b>	<b>1</b>
<b>I.1 LIBERACIÓN DE ATP.....</b>	<b>2</b>
<b>I.2 CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS.....</b>	<b>3</b>
<b>I.2.a. RECEPTORES P2X.....</b>	<b>4</b>
<b>I.2.b. MECANISMOS DE ACCIÓN (P2X).....</b>	<b>7</b>
<b>I.2.c. RECEPTORES P2Y.....</b>	<b>8</b>
<b>I.2.d. VIAS DE SEÑALIZACIÓN (P2Y).....</b>	<b>9</b>
<b>I.3 DISTRIBUCIÓN Y EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS RECEPTORES P2.....</b>	<b>12</b>
<b>I.3.a. SISTEMA NERVIOSO.....</b>	<b>12</b>
<b>I.3.b. SISTEMA HEMATOPOYÉTICO.....</b>	<b>13</b>
<b>I.3.b.1. RECEPTORES P2 EN CÉLULAS MIELOIDES.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3.b.2. RECEPTORES P2 EN PLAQUETAS.....</b>	<b>14</b>
<b>I.3.b.3. RECEPTORES P2 EN ERITROCITOS.....</b>	<b>14</b>
<b>I.3.b.4. RECEPTORES P2 EN LINFOCITOS.....</b>	<b>15</b>
<b>I.3.c. PROLIFERACIÓN Y CRECIMIENTO CELULAR.....</b>	<b>15</b>
<b>I.4 ATP COMO INDUCTOR DE APOPTOSIS.....</b>	<b>16</b>
<b>I.5 PURINAS Y SU PAPEL EN LA INFLAMACIÓN.....</b>	<b>16</b>
<b>I.6 ATP PARTICIPA EN SEÑALES INVOLUCRADAS EN EL DOLOR.....</b>	<b>17</b>
<b>I.7 FOLICULOGÉNESIS Y OVULACIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>I.8 REGULACIÓN DE LA FOLICULOGÉNESIS POR TRANSMISORES.....</b>	<b>22</b>
<b><u>II. JUSTIFICACIÓN.....</u></b>	<b>24</b>
<b><u>III. HIPÓTESIS.....</u></b>	<b>24</b>
<b><u>IV. OBJETIVOS.....</u></b>	<b>24</b>
<b><u>V. MATERIAL Y MÉTODOS.....</u></b>	<b>25</b>
<b>V.1. GELATINIZACIÓN DE PORTAOBJETOS.....</b>	<b>25</b>
<b>V.2 DISECCIÓN DE OVARIOS.....</b>	<b>26</b>
<b>V.3 INMUNOHISTOQUÍMICA.....</b>	<b>26</b>
<b><u>VI. RESULTADOS.....</u></b>	<b>29</b>
<b>VI. INMUNODETECCIÓN DE RECEPTORES P2 EN OVARIO.....</b>	<b>29</b>
<b>VI.1 OVARIOS TRATADOS CON HEMATOXILINA Y EOSINA.....</b>	<b>29</b>

VI.2 IDENTIFICACIÓN DE RECEPTORES PURINÉRGICOS P2X <sub>1</sub> EN OVARIO.....	32
VI.3 IDENTIFICACIÓN DE RECEPTORES PURINÉRGICOS P2X <sub>4</sub> EN OVARIO.....	33
VI.4 IDENTIFICACIÓN DE RECEPTORES PURINÉRGICOS P2X <sub>7</sub> EN OVARIO.....	37
VI.5 COLOCALIZACIÓN DE RECEPTORES PURINÉRGICOS P2X <sub>4</sub> Y P2X <sub>7</sub> CON LA CITOQUERATINA ENDO-A EN EL EPITELIO OVÁRICO.....	41
VI.6 COLOCALIZACIÓN DE RECEPTORES PURINÉRGICOS P2X <sub>7</sub> y P450 <sup>scc</sup> EN CT.....	43
VI.7 IDENTIFICACIÓN DE RECEPTORES PURINÉRGICOS P2X <sub>2-3-5-6</sub> EN OVARIO.....	45
VI.8 IDENTIFICACION DE RECEPTORES PURINÉRGICOS EN CORTES DE CEREBRO.....	46
VI.9 IDENTIFICACION DE RECEPTORES PURINÉRGICOS P2Y <sub>2</sub> EN OVARIO.....	48
<u>VII. DISCUSIÓN</u> .....	51
VII.1 ATP EN EL OVARIO.....	51
VII.2 RECEPTORES PURINÉRGICOS EN OVARIO.....	52
VII.2.a RECEPTORES P2X <sub>1</sub> .....	52
VII.2.b RECEPTORES P2X <sub>4</sub> .....	53
VII.2.c RECEPTORES P2X <sub>7</sub> .....	54
VII.2.d RECEPTORES P2Y <sub>2</sub> .....	55
VII.3 INTERACCIÓN DE PURINAS Y PIRIMIDINAS CON FACTORES DE CRECIMIENTO .....	56
<u>VIII. CONCLUSIÓN</u> .....	57
<u>IX. REFERENCIAS</u> .....	59

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### FIGURAS

<b>Fig. 1</b> Esquema estructural de una subunidad del receptor P2X.....	5
<b>Fig. 2</b> Mecanismo de acción de los receptores P2X.....	7
<b>Fig. 3</b> Esquema representativo de los receptores P2Y.....	8
<b>Fig. 4</b> Esquema que muestra los mecanismos de acción de los receptores P2X y P2Y al ser activados por el ATP.....	11
<b>Fig. 5</b> Liberación y acciones del ATP sobre las células del sistema nervioso central.....	13
<b>Fig. 6</b> Esquema de foliculogénesis en el ovario.....	18
<b>Fig. 7</b> Esquema de un ovario representando el trayecto de un folículo destinado a ser ovulado.....	21
<b>Figura 8.</b> Esquema de la técnica de inmunohistoquímica.....	27
<b>Fig 9.</b> Histología de un corte de ovario de 10µm en campo claro, teñido con hematoxilina y eosina.....	30
<b>Fig 10.</b> Cortes de ovario de 10µm en campo claro, teñidos con hematoxilina y eosina.....	31
<b>Fig 11.</b> Localización de receptores purinérgicos P2X <sub>1</sub> en ovarios de ratón.....	32
<b>Fig 12.</b> Localización de receptores purinérgicos P2X <sub>1</sub> en vasos sanguíneos en el ovario.....	33
<b>Fig 13.</b> Localización de receptores P2X <sub>4</sub> empleando inmunohistoquímica en cortes de ovario.....	34
<b>Fig 14.</b> Amplificación de algunas regiones del ovario para identificar la localización celular de los receptores P2X <sub>4</sub> .....	35
<b>Fig 15.</b> Amplificación del EO y FPr.....	35
<b>Fig 16.</b> Amplificación de FP y FPr, expresando receptores purinérgicos en sus ovocitos (OO) y CG.....	36
<b>Fig 17.</b> Identificación de receptores purinérgicos P2X <sub>7</sub> en ovarios de ratón.....	37
<b>Fig 18.</b> Identificación por inmunohistoquímica de receptores purinérgicos P2X <sub>7</sub> en ovarios de ratón.....	38
<b>Fig 19.</b> Identificación de receptores purinérgicos P2X <sub>7</sub> en folículos antrales (FA). ....	39
<b>Fig 20.</b> Identificación de receptores purinérgicos P2X <sub>7</sub> en folículos en diferentes etapas de desarrollo.....	40

<b>Fig 21.</b> Inmunohistoquímica con doble marcaje en cortes de ovario de ratón.....	42
<b>Fig 22.</b> Inmunohistoquímica con doble marcaje en cortes de ovario de ratón.....	43
<b>Fig 23.</b> Inmunohistoquímica con doble marcaje en cortes de ovario de ratón (40X)...	44
<b>Fig 24.</b> Inmunohistoquímica con doble marcaje de FS y EO en cortes de ovario de ratón (40X).....	45
<b>Fig 25.</b> Cortes sagitales de cerebelo de rata teñidos con hematoxilina y eosina.....	46
<b>Fig 26.</b> Cortes sagitales de cerebelo de 10µm.....	48
<b>Fig 27.</b> Localización de receptores purinérgicos P2Y <sub>2</sub> en ovarios de ratón.....	49

## **TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Propiedades farmacológicas de las diferentes subunidades de los receptores P2X.....	6
<b>Tabla 2.</b> Propiedades farmacológicas de los diferentes receptores P2Y y las proteínas G efectoras para cada subtipo, así como los segundos mensajeros involucrados.....	10
<b>Tabla 3.</b> Expresión de receptores purinérgicos en ovario de ratón.....	50

## RESUMEN

El folículo es la unidad funcional del ovario y lo constituyen principalmente las células de la granulosa (CG), las células de la teca (CT), y el ovocito. Estos tipos celulares mantienen una comunicación estrecha para lograr el crecimiento y maduración del ovocito. Esta comunicación celular es del tipo química, eléctrica y metabólica e implica la participación de diferentes factores por ejemplo, iones, neurotransmisores, hormonas, factores de crecimiento, entre otros.

Evidencias electrofisiológicas y de biología molecular han puesto de manifiesto la expresión de receptores purinérgicos en el folículo ovárico de ratón. Con el fin de dilucidar la participación de estos receptores en el proceso de foliculogénesis, en este estudio, identificamos la expresión de los mismos por inmunohistoquímica en el ovario de ratón. Para ello, se obtuvieron cortes de ovarios de ratones de la cepa C57Black en diferentes estadios del ciclo estral y se incubaron con anticuerpos primarios, dirigidos contra los receptores purinérgicos, y posteriormente con anticuerpos secundarios acoplados a rodamina o a FITC. Los cortes fueron analizados por microscopia de fluorescencia.

Los resultados obtenidos, muestran la expresión de receptores P2X<sub>1</sub> en folículos preantrales y en el epitelio ovárico (EO). La presencia del receptor P2X<sub>4</sub> se localizó principalmente en folículos primordiales, folículos primarios y folículos secundarios, y con menor expresión en los folículos pre-antrales y antrales. Las células de la granulosa tienen un nivel mayor de expresión del receptor P2X<sub>4</sub> en comparación a los ovocitos, en los diferentes folículos. Además, el EO expresa abundantemente este receptor. Con respecto al receptor P2X<sub>7</sub>, la mayor inmunoreactividad la presentaron las CT de los folículos antrales en las últimas etapas del desarrollo. Las CG de estos folículos expresan en menor cantidad este receptor. En el EO se observó también la expresión del receptor P2X<sub>7</sub>. Por último, la expresión del receptor P2Y<sub>2</sub> fue muy abundante en todas las células que conforman al ovario incluyendo al ovocito, aunque la más predominante se localizó en el EO. La expresión de estos receptores en las diferentes etapas del ciclo estral parece no ser modificada. La expresión de los receptores P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>5</sub> y P2X<sub>6</sub> no se pudo poner de manifiesto en ninguna de las células que conforman al ovario con la metodología empleada en este estudio.

## I. INTRODUCCIÓN

Las purinas (adenosina, ADP y ATP) y pirimidinas (UDP y UTP) tienen acciones en la regulación de una gran variedad de funciones en diferentes tejidos, tanto en vertebrados como en invertebrados, participando en diferentes procesos celulares, tales como el desarrollo, la proliferación y la diferenciación celular.

El ATP es un compuesto que se encuentra en todas las células vivas. Está involucrado en la captura de energía libre de procesos catabólicos y es capaz de transmitir esta energía libre a energía que es requerida en diversas reacciones que se llevan a cabo en todos los organismos vivos. El ATP es generado durante la glicólisis y a través de la fosforilación oxidativa en la mitocondria. La ATP sintetasa es la encargada de producir ATP, el cual después es transportado fuera de la mitocondria por medio de transportadores de nucleótidos, estos intercambian una molécula de ATP por una de ADP. La mayor parte del ATP es utilizado por la enzima ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  que participa manteniendo el potencial de membrana de la célula. El ATP intracelular también provee una fuente de substrato para la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática y para la ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma, la cual libera  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma permitiendo controlar el balance de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, la síntesis de GTP, la actividad de proteínas G y varias proteínas cinasas, involucradas en la transducción de señales (ver revisión: Sperlágh & Vizi, 1996).

En condiciones metabólicas normales, los niveles citoplasmáticos de ATP son de 3-10 mM, pero estas concentraciones pueden ser superiores en el caso de vesículas presentes en las terminales nerviosas donde su concentración puede llegar hasta 200 mM (Stjarne, 1989).

En efecto, el ATP puede actuar como neurotransmisor y ser almacenado en vesículas solo o junto con otros neurotransmisores como la acetilcolina (ACh) en el sistema nervioso central y periférico. Similarmente, la noradrenalina y el ATP pueden ser almacenados en terminales nerviosas. En este caso los nucleótidos vesiculares son nombrados co-transmisores. La proporción de ATP vesicular con otros neurotransmisores varía dependiendo de su localización (Sneddon et al., 1982; Lundberg et al., 1990; Todorov et al., 1994).

## I.1 Liberación de ATP

Como ya se mencionó, el ATP puede tener una función extracelular y existen evidencias que muestran que el ATP es liberado por tejidos neuronales (principalmente de nervios sensoriales) a partir de varios estímulos despolarizantes, y de tejidos no neuronales.

Los pioneros en estos hallazgos fueron Drury & Szent-György (1929), quienes reportaron que las purinas extracelulares eran responsables de un efecto cronotrópico negativo en el corazón, ya que provocaba una dilatación de los vasos coronarios. Los efectos no cardiovasculares de estos compuestos fueron establecidos más tarde en el tejido vascular, intestino, vejiga, vagina y otros órganos viscerales (Burnstock, 1972; ver revisión: Ralevic & Burnstock, 1998).

Holton (1959) demostró que el ATP era liberado de las terminales nerviosas sensoriales por la estimulación del mismo nervio, estos resultados lo llevaron a proponer que el ATP podía tener un papel importante en la transmisión química.

La demostración de que el ATP era sintetizado, almacenado y liberado de nervios no-colinérgicos no-adrenérgicos (NCNA) estimulando al músculo liso intestinal y el hecho de que su adición imitaba los efectos del nervio estimulado sobre estos músculos, llevaron a proponer que el ATP era un transmisor liberado por nervios inhibitorios no adrenérgicos en el intestino. Entonces se sugirió que el ATP puede ser liberado como un neurotransmisor primario por nervios NCNA que proveen a una gran variedad de capas vasculares y órganos viscerales, los cuales fueron nombrados “nervios purinérgicos” (Silinsky 1973; Zimmermann 1994; Vizi & L’abos, 1991; Katsuragi et al., 1991).

Burnstock (1972 y 1978) demostró que en el sistema nervioso autónomo, el ATP puede actuar como co-transmisor con ACh en la vejiga y con noradrenalina en vasos deferentes, en arteria y aorta de rata.

A nivel de sistema nervioso periférico, el ATP es un neurotransmisor de excitación rápida en sinapsis entre neuronas asociadas con transmisión ganglionar en el sistema simpático, parasimpático y entérico. En el sistema nervioso central, la liberación de ATP no está distribuida uniformemente. La estimulación eléctrica directa en la corteza motora sensorial en rata lleva a la liberación de ATP y la aplicación de ATP exógeno produce un efecto excitatorio. Estos hallazgos sugirieron que el ATP podría ser un co-transmisor con la calcitonina, generando la liberación

del péptido Y y la sustancia P en nervios motores sensoriales y ser parte del mecanismo de transmisión del dolor (ver sección I.6), (Burnstock, 1996).

La liberación de ATP en células no neuronales, fue demostrada en los años 60's en estudios de músculo esquelético, cuando se encontró que estas purinas aparecían en la circulación en el antebrazo humano en respuesta a un esfuerzo. Esto sugirió que el ATP podría originarse de células musculares activas. Otros estudios realizados con células aisladas, demostraron que las células que estaban presentes en el sistema vascular tales como plaquetas, glóbulos rojos, células mononucleares (Sprague et al., 1998), células endoteliales (Knight et al., 2002) y células del músculo liso, liberaban ATP principalmente por una estimulación mecánica (para ver revisión: Bodin & Burnstock, 2001).

En las dos últimas décadas, se ha demostrado que el ATP puede ser liberado por otros tipos celulares como son las células  $\beta$  pancreáticas (Hazama et al., 1998), astrocitos (Cotrina et al., 1998), células gliales (Queiroz et al., 1999), células de Sertoli (Laleveé et al., 1999), ovocitos (Aleu et al., 2003), osteoblastos (Romanello et al., 2001), etc. La liberación de ATP por estas células no-neuronales puede deberse a diversos estímulos como hipoxia, deformación, estimulación mecánica, acidosis y choque osmótico y el propio ATP puede inducir su liberación.

En general, el ATP una vez liberado en el fluido extracelular, es degradado por ecto-enzimas localizadas en la membrana de las células y entonces los niveles extracelulares de ATP medidos en los tejidos reflejan no solamente la relación de la liberación del ATP, sino también la relación de ATP que se está hidrolizando, la cual es dependiente de la actividad y localización de las ecto-ATPasas en los diferentes tejidos. La más prominente de estas enzimas es la familia de las ecto-nucleotidasas 5'-trifosfato difosfohidrolasa (sus siglas en inglés, NTPDase) (Lazarowski, 2003).

## **I.2 CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS**

Las purinas y pirimidinas, son moléculas señal que regulan una gran diversidad de efectos biológicos vía receptores específicos de membrana, llamados receptores de purinas o purinorreceptores.

El amplio rango de respuestas en tejidos blanco a adenina y ATP extracelulares, fue reportado por Burnstock (1978) quien además propuso la primera

clasificación para los receptores de estos compuestos, ubicándolos en dos grandes familias: receptores purinérgicos P1, que exhiben un orden de potencia de adenosina>AMP>ADP>ATP, y los receptores purinérgicos P2, los cuales muestran un orden potencial de ATP>ADP>AMP>adenosina.

Los diferentes efectos fisiológicos provocados por una simple molécula como lo es el ATP, han sugerido que varios receptores podrían estar involucrados. La clasificación y reconocimiento de los receptores para ATP en los diversos tejidos han sido difíciles, debido a que los agonistas y antagonistas para estos receptores no son específicos, sin embargo, actualmente se usan criterios moleculares para su clasificación. Esto ha permitido agrupar a los receptores P2 en dos subtipos: los receptores *P2X* que son receptores catiónicos activados por ligando (ionotrópicos) y los receptores *P2Y* que son receptores acoplados a proteínas G (metabotrópicos). De los primeros se han clonado 7 subtipos (*P2X*<sub>1</sub>, *P2X*<sub>2</sub>, *P2X*<sub>3</sub>, *P2X*<sub>4</sub>, *P2X*<sub>5</sub>, *P2X*<sub>6</sub>, *P2X*<sub>7</sub>) y de los últimos 8 (*P2Y*<sub>1</sub>, *P2Y*<sub>2</sub>, *P2Y*<sub>4</sub>, *P2Y*<sub>6</sub>, *P2Y*<sub>11</sub>, *P2Y*<sub>12</sub>, *P2Y*<sub>13</sub> y *P2Y*<sub>14</sub>), (para ver revisión: Ralevic & Burnstock, 1998).

### **I.2.a. RECEPTORES P2X**

Los receptores de membrana *P2X*, son canales iónicos activados por la unión del ATP extracelular.

Existen siete genes que codifican para cada una de las subunidades de estos receptores.

Las subunidades de *P2X* varían en cuanto al número de aminoácidos, los cuales van desde 384 (*P2X*<sub>4</sub>) a 595 (*P2X*<sub>7</sub>) aminoácidos. Cada subunidad tiene dos regiones hidrofóbicas que atraviesan a la membrana, están constituidas aproximadamente por 20 aminoácidos cada una y determinan la formación del poro iónico del receptor (Rassendren et al., 1997; North & Surprenant, 2000.). Entre estas dos regiones existe un dominio extracelular que posee 270 aminoácidos aproximadamente con una serie de 10 cisteínas distribuidas a través de este dominio que son muy conservadas entre las diferentes subunidades. Estos residuos pueden ser oxidados y entonces contribuir a la estructura terciaria de la proteína a través de la formación de puentes disulfuro.

El carboxilo (COOH) y amino (NH<sub>2</sub>) terminal se encuentran del lado citoplasmático (figura 1). Las diferentes proteínas tienen entre sí una similitud del

40% al 55%, siendo la región amino terminal altamente conservada entre las siete subunidades, mientras que la región carboxilo terminal diverge en secuencia considerablemente. Aunque es menos conservada esta región poco se sabe si esta diferencia determina la conducta funcional de los diferentes receptores P2X.

Utilizando técnicas de mutagénesis, entre otras, se tiene evidencia de que la isoleucina (Ile) en la posición 67 está involucrada con el sitio de unión del ATP a su receptor (figura 1), (Lin-Hua, 2000).

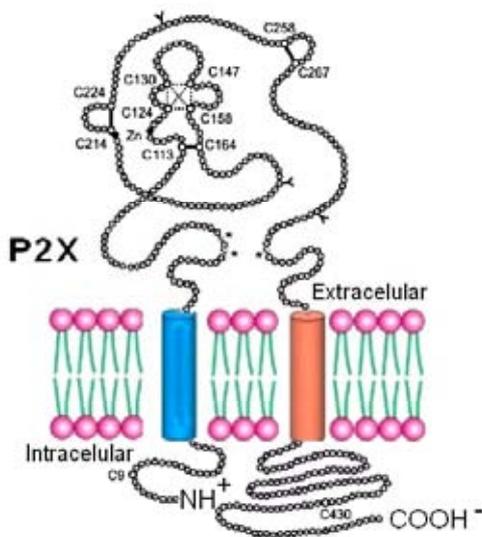


Fig. 1 Esquema estructural de una subunidad del receptor P2X. Estos receptores presentan dos regiones transmembranales y una asa extracelular. Las regiones amino y carboxilo están ubicadas intracelularmente. Los sitios de unión al ATP son marcados con asteriscos. También se muestra la posición de las cisternas (C), algunos sitios de glicosilación (Y) y un sitio de unión del Zn. (Lin-Hua, 2000).

Otra característica de estos receptores es que todas las subunidades tienen secuencias consenso para ser glicosiladas y estas modificaciones son esenciales para su transporte a la membrana celular.

Todas las subunidades excepto P2X<sub>6</sub> se expresan fácilmente en sistemas heterólogos y se presume que forman canales homoméricos. Por otra parte, existen evidencias tanto funcionales como bioquímicas de la formación de receptores P2X heteromultiméricos, por la asociación de subunidades P2X<sub>2</sub>/P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>1</sub>/P2X<sub>5</sub> y P2X<sub>4</sub>/P2X<sub>6</sub>.

Algunas propiedades farmacológicas y datos sobre la localización de estos receptores se resumen en la Tabla 1.

SUBTIPO DE RECEPTOR P2X	No. de AMINOÁCIDOS	AGONISTAS	ANTAGONISTAS	LOCALIZACIÓN
P2X <sub>1</sub>	399	ATP>2meSATP> αβmeATP	Suramina=PPADS	Cerebro, cerebelo, sistemas sensoriales, ganglios autónomos, vejiga urinaria, vasos deferentes.
P2X <sub>2</sub>	472	2meSATP>ATP	PPADS>suramina	Cerebro, médula espinal, cerebelo, ganglio espinal coclear, sistema entérico.
P2X <sub>3</sub>	393	2meSATP>ATP	PPADS>suramina	Sistemas sensoriales, ganglios autónomos, cerebro, corazón, médula espinal.
P2X <sub>4</sub>	389	ATP>>2meSATP>> αβmeATP	PPADS>suramina	Cerebro, cerebelo, médula espinal, sistemas sensoriales, islotes pancreáticos.
P2X <sub>5</sub>	455	ATP>2meSATP	PPADS>suramina	Sistemas sensoriales, cerebro.
P2X <sub>6</sub>	379	2meSATP>ATP	PPADS=suramina	Sistemas sensoriales, ganglios autónomos, cerebro.
P2X <sub>7</sub>	595	ATP>2meSATP	PPADS>suramina	Sistemas sensoriales, macrófagos, cerebro.
P2X <sub>2</sub> /P2X <sub>3</sub>		2meSATP>ATP> αβmeATP	PPADS	Sistemas sensoriales, ganglios simpáticos y cerebro
P2X <sub>1</sub> /P2X <sub>5</sub>		ATP>2meSATP> αβmeATP,	PPADS>suramina	Músculo liso de vejiga urinaria.
P2X <sub>4</sub> /P2X <sub>6</sub>		ATP>2meSATP> αβmeATP,	suramina	Vasos deferentes.

**Tabla 1.** Propiedades farmacológicas de las diferentes subunidades de los receptores P2X, (Nörenberg & Illes, 2000)

## I.2.b. MECANISMOS DE ACCIÓN (P2X)

Esta clase de receptores canal, son permeables a diversos cationes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) de manera no selectiva. Al activarse el receptor comienza un flujo rápido de iones a través de la membrana celular que puede conducir a un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e inducir la despolarización de las células. El flujo directo de este ión proporciona una cascada de señalización importante para las células, ya que puede activar o inactivar a diversas enzimas citoplasmáticas lo que puede incluso desencadenar un efecto directo sobre la regulación de la expresión génica (figura 2).

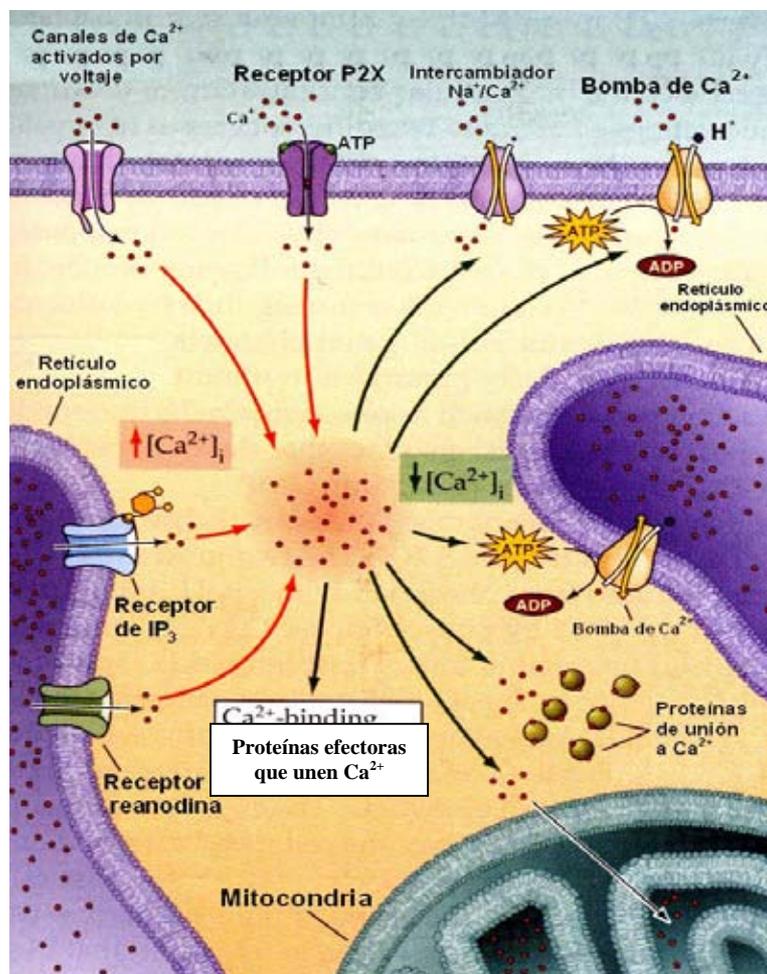


Fig. 2 Mecanismo de acción de los receptores P2X. Al unirse el ATP al receptor P2X, se induce la apertura del poro favoreciendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y produce un cambio en la polaridad de la célula, esto puede activar canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por voltaje. El incremento en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular puede inducir la activación de diferentes proteínas citoplásmicas y de membrana. La participación de intercambiadores  $\text{Na}/\text{Ca}$ , la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  y las proteínas de unión regulan el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Por otra parte la activación de receptores a  $\text{IP}_3$  o receptores a reanodina propician la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  que se encuentra almacenado en el retículo endoplásmico. (Modificado de Purves, et al., 2001)

### I.2.c. RECEPTORES P2Y

Los receptores P2Y, son activados por nucleótidos de purinas y pirimidinas.

Este tipo de receptores tienen de 308 a 377 aminoácidos con un peso de 41 a 53 kDa. Poseen siete dominios transmembranales (TM) y están acoplados a proteínas G. Estos dominios tienen aminoácidos hidrofóbicos, formando  $\alpha$ -hélices de aproximadamente 21 a 28 aminoácidos. Los dominios TM son cruciales para la unión del ligando y son altamente conservados entre los ocho subtipos de receptores, principalmente en los dominios TM2, TM3 y TM5. Estos dominios están conectados por tres asas hidrofílicas extracelulares y tres intracelulares de igual tamaño (figura 3). Estas proteínas pueden ser glicosiladas en la segunda asa extracelular y esta región parece estar involucrada en la conformación estable de la proteína, además de dar protección al ataque de proteasas y modular la función de la proteína. La tercera asa intracelular está implicada en la selectividad de unión a la proteína G (para ver revisión: Ralevic & Bursntock, 1998; Von Kügelgen & Wetter A., 2000).

La región amino terminal de la proteína está ubicada del lado extracelular y el carboxilo terminal del lado intracelular. Entre las secuencias de estos receptores, las regiones menos conservadas se encuentran en la región carboxilo terminal.

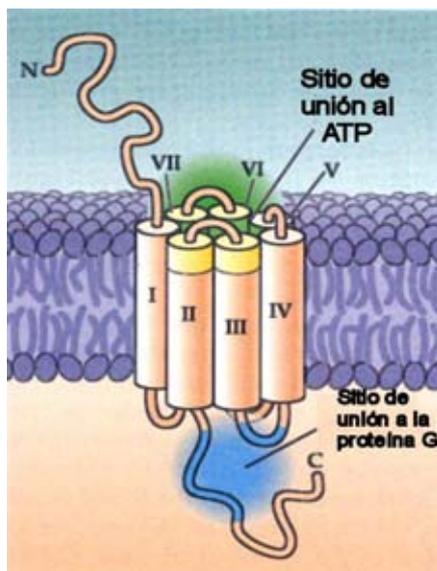


Fig. 3 Esquema representativo de los receptores P2Y. Están constituidos por 7 pases transmembranales (TM), un amino terminal extracelular y un carboxilo terminal intracelular. Parte de esta última región está acoplada a proteínas G. (Modificado de Purves, et al., 2001)

Las propiedades electrofisiológicas y la localización de estos receptores, entre otras características, están resumidas en la tabla 2.

#### **I.2.d. VIAS DE SEÑALIZACIÓN (P2Y)**

Una gran diversidad de estímulos extracelulares (neurotransmisores, hormonas, entre otros) tienen efectos fisiológicos por la activación de cascadas de señalización por segundos mensajeros que involucran la acción de proteínas G.

Como ya se mencionó, los receptores P2Y están acoplados a proteínas G, de tal manera que cuando el ligando se une al receptor purinérgico se activa a la proteína G. Esta proteína está conformada por tres subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), al ser activada se disocia la subunidad  $\alpha$  que a su vez está unida a GTP, este complejo interactúa con una proteína blanco o un canal iónico provocando su activación o inhibición. Existen tres clases de proteínas G, que se distinguen por su proteína efectora, sus segundos mensajeros, sus efectores tardíos y sus acciones finales. Estas proteínas son:  $G_s$  estimulan a la adenilato ciclasa (AC),  $G_q$  activa a la fosfolipasa C (PLC) y  $G_i$  inhibe a la adenilato ciclasa.

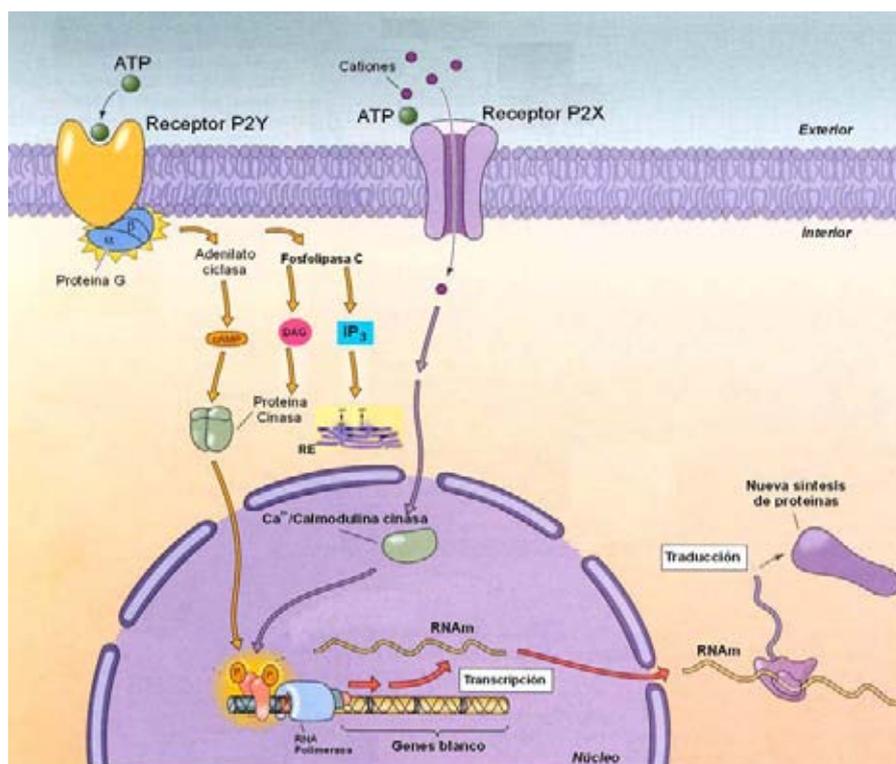
Los subtipos de receptores P2Y tienen diferentes cascadas de señalización, dependiendo de la proteína G a la que están acoplados (tabla 2).

La activación de la fosfolipasa C está muy frecuentemente asociada con los receptores P2Y. Cuando esta enzima se activa hidroliza fosfolípidos de membrana (fosfatidil inositol bifosfato ( $PIP_2$ )) produciendo inositol trifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DAG). El  $IP_3$  formado se une a receptores localizados en el retículo endoplásmico y provoca la liberación de  $Ca^{2+}$  de este reservorio al espacio citoplasmático. El incremento de este ión puede activar canales iónicos dependientes de  $Ca^{2+}$  presentes en la membrana celular provocando un flujo de iones a través de la membrana y activar a otras proteínas citoplásmicas.

Por otra parte, el DAG formado a través de la activación de la PLC, se puede unir a la Cinasa C, para activar una serie de reacciones de fosforilación, que pueden conducir a la regulación de proteínas de membrana o del citoplasma. La activación de la vía de señalización vía  $IP_3$  o DAG puede influir también sobre la regulación de la expresión de genes de la célula activada (figura 4).

RECEPTOR	No. de AMINOÁCIDOS	AGONISTA	ANTAGONISTA	SEÑALIZACIÓN	LOCALIZACIÓN
P2Y <sub>1</sub>	362	ADP>ATP>>UDP, UTP	2MeSADP>ADP> 2MeSATP>ATP	Gq/PLC/Ca <sup>2+</sup> + PKC	Músculo liso y esquelético, endotelio, tejido neuronal, páncreas, bazo, cerebro y médula espinal.
P2Y <sub>2</sub>	373	ATP=UTP>>ADP, UDP	UTP=ATP>ATP <sub>γ</sub> S	Gq/PLC/Ca <sup>2+</sup> + PKC	Corazón, músculo esquelético, bazo, riñón, hígado y epitelio.
P2Y <sub>4</sub>	352	UTP>>ATP, UDP, ADP	UTP> UTP <sub>γ</sub> S>>ATP, UDP	Gq/PLC/Ca <sup>2+</sup> + PKC	Placenta, pulmón y músculo liso.
P2Y <sub>6</sub>	379	UDP>UTP>ADP>>ATP	UDP=5BrUDP>>UTP>2MeS ADP	Gq/PLC/Ca <sup>2+</sup> + PKC	Pulmón, corazón, aorta, bazo, placenta, timo y cerebro.
P2Y <sub>11</sub>	371	ADP>ATP>>UDP, UTP	ATP <sub>γ</sub> S=BzATP>ATP>2MeS ATP	Gq/PLC/Ca <sup>2+</sup> + PKC y Gs/AC/ >AMPc	Leucocitos.
P2Y <sub>12</sub>	342	ADP>ATP>>UDP, UTP	AR-C 69931MX.	Gi/AC/<AMPc; canales iónicos	Plaquetas e hígado.
P2Y <sub>13</sub>	333	ADP>ATP>>UDP, UTP	reactive blue 2, suramin, (AR-C67085MX).	Gi/AC/<AMPc; canales iónicos	Vasos deferentes, cerebro, vaso.
P2Y <sub>14</sub>	338	UDP-glucosa>>UTP, ATP, UDP, ADP		Gi/AC/<AMPc; canales iónicos	Células T.

**Tabla 2.** Propiedades farmacológicas de los diferentes receptores P2Y y las proteínas G efectoras para cada subtipo, así como los segundos mensajeros involucrados. aa=aminoácidos, Gq=Proteína G que activa a la fosfolipasa C, PLC=Fosfolipasa C, Ca<sup>2+</sup>=Calcio, PKC=Proteína cinasa C, Gs/Gi=Proteína G estimuladora (s) e inhibidora (i) de la adenilato ciclasa, AMPc=adenosín monofosfato-cíclico, (Dubyak, 2003; Lazarowski, 2003).



**Fig. 4** Esquema que muestra los mecanismos de acción de los receptores P2X y P2Y al ser activados por el ATP. El receptor P2Y al unirse a su ligando (ATP o UTP) activa a proteínas G y estas a su vez estimulan o inhiben a la Adenilato ciclasa, pueden también estimular a la fosfolipasa C la cual genera segundos mensajeros. El AMPc y el DAG activan a las cinasas quienes fosforilan proteínas involucradas en la regulación de genes. El IP<sub>3</sub> induce la liberación de Ca<sup>2+</sup> de almacenes intracelulares, este también posee funciones de regulación génica. Los receptores P2X al ser activado permite la entrada de Ca<sup>2+</sup> extracelular provocando un aumento en las concentraciones de este ión intracelularmente. (Modificado de Purves, et al., 2001)

La estimulación de los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub> lleva a la activación de la fosfolipasa C (PLC) seguido de la formación de IP<sub>3</sub> y movilización de calcio intracelular. Los receptores P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, P2Y<sub>14</sub>, están acoplados a proteínas G<sub>i</sub> y la estimulación de estos subtipos llevan a la inhibición de la acumulación del AMPc intracelular. El receptor P2Y<sub>11</sub> es el único subtipo que activa a la proteína AC y a la PLC, llevando a la acumulación de AMPc y de IP<sub>3</sub> (Sak et al., 2003).

### **I.3 DISTRIBUCIÓN Y EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS RECEPTORES P2**

Después de su liberación a los fluidos extracelulares por lisis celular, exocitosis o a través de proteínas transportadoras de membrana, los nucleótidos y los nucleósidos, pueden ejercer una gran variedad de efectos biológicos a través de su unión a diferentes receptores. Sin embargo, pocas funciones fisiológicas de estos receptores han sido firmemente establecidas, particularmente por la carencia de agonistas y antagonistas específicos.

Además de su función como neurotransmisores los nucleótidos y nucleósidos, son potentes reguladores del crecimiento y la diferenciación celular. En células neuronales y del sistema inmune y en las de los sistemas cardiovascular y respiratorio, estos compuestos pueden actuar como reguladores fisiológicos modulando la proliferación y la apoptosis celular durante el desarrollo o en los tejidos de animales adultos (Chow, et al., 1997) o en la reparación del tejido o remodelación después de un trauma o isquemia, (Abbracchio, 1997; Di Virgilio et al., 2001; Choi, et al., 2003<sup>a,b</sup>).

#### **I.3.a. SISTEMA NERVIOSO**

Las acciones del ATP sobre células del SNC, se pueden llevar a cabo a través de la liberación de esta sustancia de diferentes células como se esquematiza en la figura 5. Las neuronas [1] (Ribeiro, 1995), o astrocitos [2] (King et al., 1996; Troadec et al., 1999), pueden liberar ATP junto con factores tróficos y pueden estimular la síntesis de DNA y proliferación de la microglía, astrocitos y células endoteliales [3]. La microglía al ser estimulada libera varios factores de crecimiento polipeptídicos y citocinas, las cuales estimulan la proliferación de células endoteliales de capilares en el cerebro [4] (Sawada et al., 1989) y pueden provocar cambios en la proliferación y reacciones diversas en astrocitos [5].

Se ha propuesto que el ATP puede actuar sinérgicamente con los factores de crecimiento polipeptídicos sobre células endoteliales y astrocitos, contribuyendo a los cambios plásticos de estas células en respuesta a un trauma o a isquemia (Neary et al., 1996).

Los astrocitos se hacen reactivos en respuesta a ATP, factores de crecimiento polipeptídico o a una combinación de ambos, liberando neurotrofinas [6] y

pleiotrofinas [7]. Estas proteínas tróficas son neuroprotectores y minimizan el daño neuronal. También ayudan al crecimiento de neuritas [8], promoviendo la formación de nuevas sinapsis que pueden reemplazar las dañadas por alguna enfermedad.

Existe evidencia de que el ATP puede también causar apoptosis [9]. Aunque el significado patofisiológico de este efecto aún no ha sido demostrado, este puede jugar un papel en el desarrollo del SNC (cuando un gran número de células sufren muerte celular programada) y en el remodelado de los circuitos del cerebro debido a trauma o isquemia (para ver revisión: Abbracchio & Burnstock, 1998).

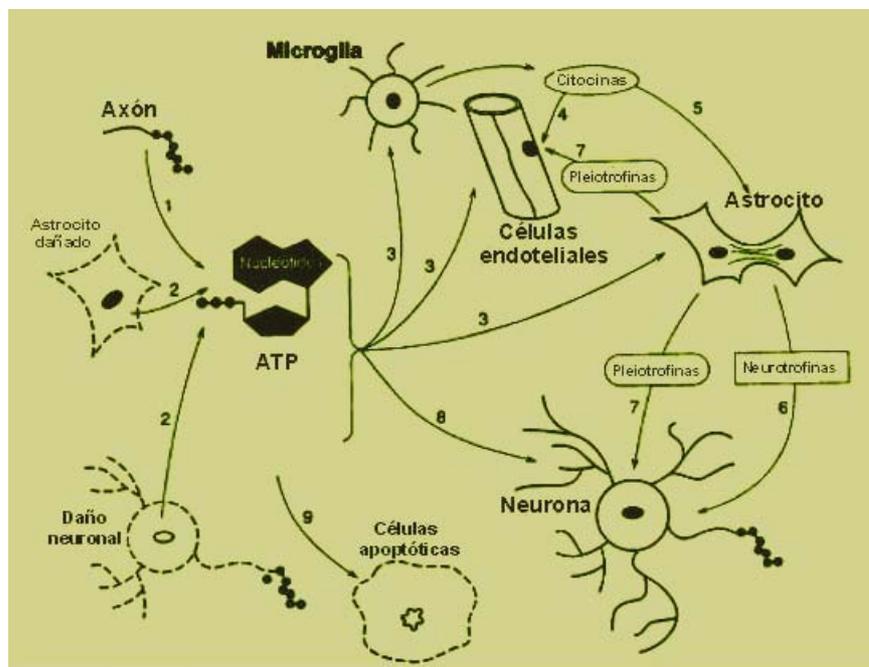


Fig. 5 Liberación y acciones del ATP sobre las células del sistema nervioso central.

(Abbracchio & Burnstock, 1998)

### I.3.b. SISTEMA HEMATOPOYÉTICO

La activación de receptores P2 específicos sobre células del sistema inmune puede modular diferentes funciones como la maduración celular y la liberación de citocinas, la activación de las células NK (por sus siglas en inglés, natural killer), además de activar funciones especializadas tales como la migración, la secreción y la fagocitosis.

### 1.3.b.1. RECEPTORES P2 EN CELULAS MIELOIDES.

Se ha observado que diversas líneas celulares de macrófagos expresan receptores purinérgicos activados por ATP de los tipos P2X y P2Y. Una de las consecuencias de la estimulación de estos receptores es que desencadenan incrementos reversibles en la permeabilidad de la membrana a solutos de bajo peso molecular. Esta permeabilidad eventualmente puede llevar a la muerte celular y existen evidencias de la participación del receptor P2X<sub>7</sub>, en este proceso. Los receptores P2 pueden también ser usados como sistema de amplificación para propagar la alarma para la generación de mediadores inflamatorios adicionales. En macrófagos, tanto de humanos como de roedores, el ATP extracelular desencadena la liberación del Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y de la interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y se ha sugerido que el ATP y otros nucleótidos funcionan como señales de alarma que alertan a los macrófagos ante un daño al tejido (Hanley et al., 2004).

### 1.3.b.2. RECEPTORES P2 EN PLAQUETAS.

La estimulación de plaquetas con ATP y sus análogos, causan un incremento de Ca<sup>2+</sup> intracelular, activación de la fosfolipasa C, inhibición de la estimulación de la adenilato ciclasa y activación de receptores de fibrinógeno. Estudios moleculares y farmacológicos han permitido caracterizar a los receptores implicados en estos eventos siendo el receptor P2X<sub>1</sub> el que está involucrado en el flujo de Ca<sup>2+</sup>, y el receptor P2Y<sub>1</sub> el asociado a la activación de la fosfolipasa C, formación de IP<sub>3</sub> y liberación de Ca<sup>2+</sup> de almacenamientos intracelulares (Di Virgilio et al., 2001; Dorsam & Kunapuli, 2004). Además, se ha sugerido que estos receptores están implicados directamente con la activación plaquetaria previniendo la hemorragia y contribuyendo a la formación de trombina (Leon et al., 2003).

### 1.3.b.3. RECEPTORES P2 EN ERITROCITOS

Existen evidencias de que el ATP causa un cambio en la permeabilidad de la membrana del eritrocito induciendo la liberación de ATP al espacio extracelular; es decir, el ATP promueve la liberación del ATP y se ha sugerido que probablemente intervenga en este evento el receptor P2X<sub>7</sub>. La liberación del ATP de los eritrocitos puede contribuir a la regulación local del flujo sanguíneo por activación de los receptores P2Y presentes en el endotelio vascular promoviendo la vasodilatación, (Di Virgilio, 2001).

#### I.3.b.4. RECEPTORES P2 EN LINFOCITOS

El ATP es capaz de activar a la PLC en las células T y células B aisladas de médula ósea de pacientes con leucemia linfoblástica crónica, debido a que expresan receptores P2Y<sub>11</sub>. También, el UDP induce la movilización de calcio intracelular por medio de receptores P2Y<sub>6</sub> en células T de sangre periférica (Sluyter et al., 2001; Sak et al., 2003).

#### I.3.c. PROLIFERACIÓN Y CRECIMIENTO CELULAR

Las purinas y pirimidinas pueden estimular el ciclo celular o inhibir el crecimiento celular, dependiendo de sus concentraciones extracelulares, del estado fisiológico de las células blanco y/o de la expresión de los subtipos de receptores en cada tipo celular.

La estimulación de la síntesis del DNA y la proliferación celular por purinas ha sido demostrada en fibroblastos 3T3 y 3T6 (Gonzales et al., 1989; Rozengurt, 1982), timocitos (Sanberg & Fredholm, 1981), células hematopoiéticas (Pospisil et al., 1993), células de músculo liso vascular (Yu et al., 1996), células endoteliales (Dusseau & Hutchins, 1988), astrocitos y líneas celulares de astrocitoma (Neary et al., 1996). En el caso de las células 3T6, el ATP puede inducir la mitosis celular a concentraciones de 50  $\mu$ M a través de la activación de los receptores P2Y, que a su vez estimulan a la fosfolipasa C y promueven la liberación de Ca<sup>2+</sup> de almacenes intracelulares sensibles al IP<sub>3</sub>. Por otra parte, concentraciones de ATP del orden de 100  $\mu$ M inhiben el crecimiento de estas células debido al arresto del ciclo celular en la fase S (Rapaport, 1983).

También se ha demostrado que los efectos mitogénicos del ATP son potenciados por factores de crecimiento polipeptídicos (Neary et al., 1994).

La modulación de la proliferación y el crecimiento celular por purinas y pirimidinas pueden jugar un papel crucial después de varias condiciones de daño tisular. Cuando las concentraciones de estos compuestos son incrementados masivamente en el sitio del daño, pueden contribuir a la iniciación de mecanismos de reparación llevando a la regeneración del tejido. Esto se ha observado en el epitelio, cerebro y sistema cardiovascular (para ver revisión: Abracchio & Burnstock, 1998). Los receptores relacionados con este efecto son los P2Y<sub>2</sub>, y la señal de transducción es regulada por proteínas Gq, y la fosfolipasa C.

#### **I.4 ATP COMO INDUCTOR DE APOPTOSIS**

Como se mencionó, el ATP puede actuar como inductor de proliferación pero también de muerte celular. De manera particular, esta sustancia puede inducir muerte celular por dos vías ya sea por necrosis o por apoptosis. La apoptosis esta relacionada con la activación de tres receptores purinérgicos: P2X<sub>7</sub> en macrófagos (Humphreys et al., 2000), y P2X<sub>1</sub> y P2Y<sub>2</sub> en timocitos y células T respectivamente (Glass et al., 2000). Por otra parte, la necrosis solo se asocia con la activación del receptor P2X<sub>7</sub>. Una explicación a esta función dual del receptor P2X<sub>7</sub> es el hecho de que este receptor puede formar poros líticos en las células conduciendo a la muerte celular independiente de Ca<sup>2+</sup>, mientras que su acción como un canal iónico selectivo activado por ligando puede generar apoptosis debido al flujo excesivo de Ca<sup>2+</sup> después de una activación prolongada y repetida del receptor. Además, la estimulación de este receptor también elimina el K<sup>+</sup> intracelular y una disminución en ello provoca la activación de la caspasa-1 y de la maduración de la IL-1β (Chow et al. 1997).

#### **I.5 PURINAS Y SU PAPEL EN LA INFLAMACIÓN**

La participación de las purinas en la regulación de las respuestas inflamatorias es compleja y en ellas parecen intervenir los receptores P1 y P2, además de varios mediadores inflamatorios, principalmente las prostaglandinas, el factor de necrosis tumoral (TNF)-α y las IL-1 y 2.

Las altas concentraciones del ATP, ADP y UTP generadas en sitios de agregación plaquetaria y de daño tisular, están involucradas en la activación de fibras sensoriales y de generación del dolor, actuando como señales para la activación de macrófagos y la infiltración de neutrófilos en el área inflamada. Los neutrófilos humanos aparentemente también utilizan receptores P2Y para reconocer nucleótidos como quimioatrayentes (Verghese et al., 1996).

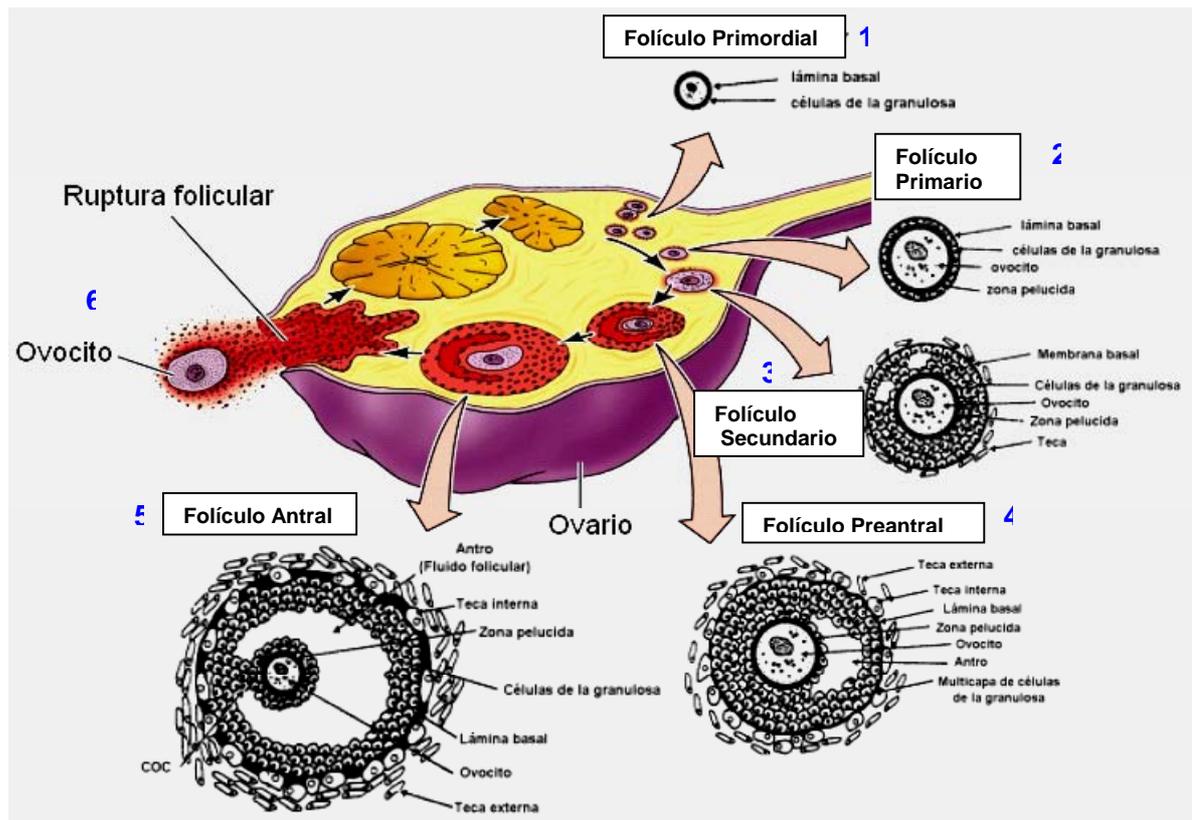
## **I.6 ATP PARTICIPA EN SEÑALES INVOLUCRADAS EN EL DOLOR**

Se ha mostrado por varios años que el ATP y la adenosina pueden estimular terminales nerviosas sensoriales en la piel, causando intenso dolor y un marcado incremento en las descargas de neuronas sensoriales. Además, los receptores P2X<sub>3</sub> tienen una distribución altamente restringida, principalmente en un conjunto de neuronas sensoriales ganglionares y en base a esto, se ha propuesto que el ATP podría participar en la generación de las señales del dolor. Un modelo propuesto a partir de una serie de evidencias sugiere que el ATP liberado del citoplasma de células dañadas al espacio extracelular puede estimular a las subunidades P2X<sub>3</sub>, llevando a la despolarización de las terminales de las fibras nerviosas nociceptivas y entonces iniciar la señal de nociceptividad (Abracchio & Burnstock, 1998).

## **I.7 FOLICULOGÉNESIS Y OVULACIÓN**

La *foliculogénesis* se puede definir como el desarrollo, crecimiento y diferenciación del ovocito así como de las diferentes células que conforman el folículo ovárico, figura 6 (Elvin & Matzuk, 1998, Van Tol & Bevers, 1999).

La foliculogénesis está controlada por señales que recibe del sistema nervioso así como de señales locales. Algunas de estas son la GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas) que se libera del hipotálamo y llega a la hipófisis anterior, los gonadotrópos que están en la adenohipófisis anterior responden a GnRH, sintetizando y liberando LH y FSH, las cuales inducen la foliculogénesis ovárica, esteroidogénesis, ovulación y formación del cuerpo lúteo.



**Fig. 6** Esquema de foliculogénesis en el ovario. La foliculogénesis es el desarrollo, crecimiento y diferenciación del ovocito y sus células foliculares. 1) El comienzo de este proceso es la aparición de células escamosas llamadas "pregranulosas" que rodean al ovocito, formando el folículo primordial. 2) Las células pregranulosas adquieren una forma cuboidal, llamadas ahora células de la granulosa (CG), el ovocito aumenta de tamaño y se forma la zona pelúcida entre el ovocito y las CG, formando el folículo primario. 3) La proliferación de CG y aparición de células de la teca que están rodeando al folículo marcan la formación del folículo secundario. 4) El folículo sigue aumentando de tamaño al igual que el ovocito. Se forman dos tipos de células de la teca: interna y externa. Aparecen pequeñas cavidades que se llenan de líquido folicular. En esta etapa el folículo es llamado folículo preantral. 5) La cavidad antral se hace mucho más prominente llevando al folículo a su máximo tamaño. Se pueden distinguir dos tipos de CG: las que rodean al ovocito denominadas células del cumulus y las que rodean a la cavidad antral llamadas CG mural. 6) Esta última etapa de la foliculogénesis culminará en la ovulación. (Modificado de Van Voorhis, 1999).

Aún cuando la LH y la FSH son fundamentales para la foliculogénesis, la producción local de diferentes sustancias también están involucradas en este proceso. Por ejemplo, existen múltiples evidencias que muestran la participación de factores de crecimiento (FC) tanto en etapas tempranas como tardías de este evento. Algunos de los FCs identificados en ovocitos de mamífero son el factor de diferenciación del crecimiento (GDF-9), la proteína morfogenética de hueso-15 (BMP-15/GDF-9B), los factores de crecimiento parecidos a la insulina IGF1 e IGF2 y los factores FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) y EGF (factor de crecimiento

epidermal), (para ver revisión: Elvin J & Matzuk M, 1998; Erickson et al, 2001; Eppig et al, 2002).

Experimentos con ratones “knockout” han demostrado que en ausencia del GDF-9, la foliculogénesis es bloqueada en la etapa preantral primaria, por lo que estos ratones son infértiles. Este factor y la proteína BMP-15 son potentes estimuladores de la mitosis en las CG *in vitro*. Un aspecto importante de los efectos mitogénicos de estos factores es que son independientes de FSH (Epifano & Dean, 2002).

Otros factores reguladores que pueden llegar a ser funcionales cuando los folículos forman el antro son IGF1/IGF2 (factores de crecimiento parecidos a la insulina) debido a la aparición de receptores IGF en las CG en esta etapa. Estos dos factores inducen la formación de esteroides (estrógenos, progesterona, andrógenos), aumentan la síntesis de AMPc y el número de receptores para la LH en las CG (para ver revisión: Fair, 2003).

Las señales paracrinas entre el ovocito y sus CG pueden ocurrir a través del FGF (factor de crecimiento fibroblástico) y del EGF (factor de crecimiento epidermal) los cuales son producidos por el ovocito y cuyos receptores son expresados por las CG. El FGF actúa como un factor mitogénico en las CG, inhibe la síntesis de estrógeno y andrógenos, así como la adquisición de receptores para la LH. El EGF por otra parte, inhibe la expresión del gen que codifica para la enzima P450 (involucrada en la producción de estradiol, y la capacidad de aromatización) inducida por la FSH en las células de la granulosa humana. Al EGF también se le atribuye la capacidad para estimular la maduración de los ovocitos, tanto en rata como en humanos. Por otra parte, el receptor c-kit está presente en el ovocito, mientras que su ligando (KL) se produce en las CG. Esta interacción se ha asociado principalmente con la estimulación del crecimiento del ovocito y el inicio del crecimiento de los folículos primordiales (Driancourt & Thuel, 1998).

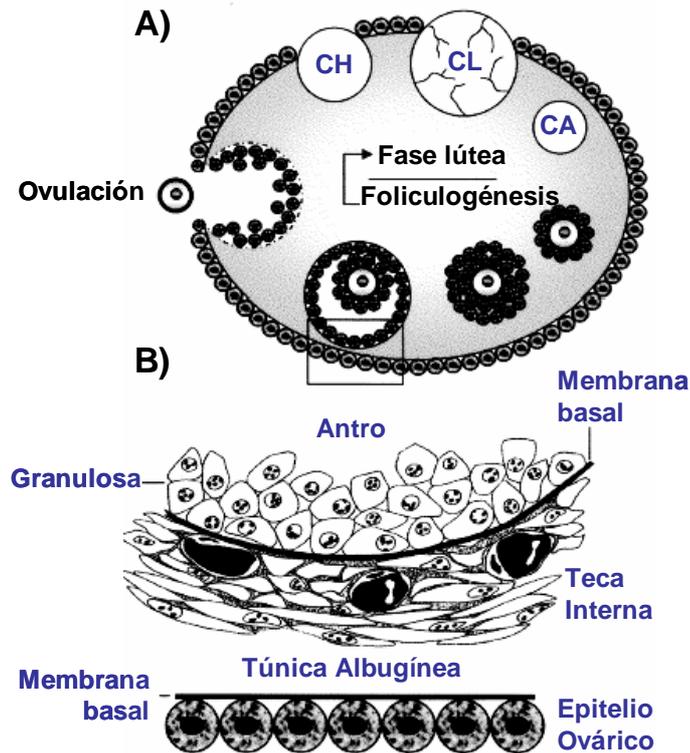
La IL-1 (Interleucina-1) es un potente bloqueador de la diferenciación ovárica, inhibe la síntesis de estrógenos, andrógenos y en el ovario de rata induce la apoptosis de las CG. El gen que codifica para la IL-1, se expresa solamente en el periodo peri-ovulatorio. Las CG, las tecas y los folículos en desarrollo sintetizan TGF- $\beta$ . En el ovario este factor influye en la diferenciación y división celular del

ovocito, estimula la formación de estrógenos en las CG e inhibe la síntesis de andrógenos en el compartimiento teca-intersticio (Driancourt & Tuel, 1998).

Otros péptidos que pueden ser sintetizados y secretados por las CG son la inhibina, la activina y la folistatina. La activina promueve la proliferación de las CG, incrementa la expresión de receptores a FSH, aumenta la expresión de la aromatasas y la producción de estrógenos e inhibe la producción de andrógenos. Estos eventos conducen a la maduración del ovocito. La folistatina puede bloquear cada una de las respuestas inducidas por la activina. La inhibina puede aumentar la producción de andrógenos inducida por LH (Alak et al., 1998). Existen evidencias de que la inhibina pueda funcionar como un inhibidor para la unión de la FSH y puede también ejercer una acción de supresión sobre la maduración del ovocito (para ver revisión: Knight & Glister, 2001).

La *ovulación* es un evento limitante en la perpetuación de las especies y puede ser definido como un proceso por medio del cual un ovocito es liberado del ovario para que pueda posteriormente ser fertilizado, ver figura 7.

El pico máximo de LH al ser liberado al torrente sanguíneo, llega al ovario desencadenando la ovulación. La ruta por la cual ejerce su efecto esta hormona es debido a que sus receptores son expresados en células de la teca (CT) y en el epitelio ovárico (EO), estimulando la secreción del factor activador de plasminógeno (PA), el cual convierte al plasminógeno en plasmina, la que a su vez activa a las colagenasas. Estas rompen la red que esta conformada por las células de la teca y la túnica albugínea (células intersticiales entre las CT y el EO) y promueve la degradación de las membranas basales que se localizan entre el EO y la túnica albugínea. La plasmina se une al TNF- $\alpha$  presente en la membrana de las células endoteliales, volviéndolo a su forma activa. El TNF- $\alpha$  activo induce la producción de las colagenasas que al actuar progresivamente dañan a la pared ovárica y así promueven la ruptura folicular, (Murdoch et al., 2001; para ve revisión: Murdoch & McDonnel, 2002).



**Fig. 7** Esquema de un ovario representando el trayecto de un folículo destinado a ser ovulado. A) El ovocito de un folículo maduro está rodeado de células del cumulus y situado dentro del líquido folicular (antro), estas células se disocian durante la ovulación y el óvulo es liberado en la cavidad antral. La degeneración del tejido más notable es en la región de contacto entre la superficie del folículo y el ovario, llevando a la formación de una marca y terminando en una ruptura. B) La pared del folículo preovulatorio está compuesta de 3 capas formadas por las células de la granulosa, las células de la teca interna y las células de la teca externa. Una membrana basal separa la granulosa de la teca. La teca externa es indispensable como tejido conectivo por inducir contracciones foliculares que propagan la expulsión del folículo. El epitelio ovárico recubre todo el ovario delimitándolo de otros tejidos, entre estas células y el folículo se encuentra la membrana basal y la túnica albugínea. (Murdoch & Gotsch, 2003)  
 CH=Cuerpo Hemorrágico, CL=Cuerpo Lúteo, CA=Cuerpo Albugíneo.

En particular el EO posee la capacidad de proliferar y diferenciarse, así como la propiedad de sintetizar diferentes moléculas entre las que se encuentran la GnRH y su receptor, también presenta receptores a FSH, LH, estrógenos, progesterona y andrógenos; todos ellos involucrados en la esteroidogénesis, la regulación en la ovulación y la foliculogénesis (Wright et al., 2002). Por otra parte, se ha demostrado que el EO también expresa receptores a diferentes factores de crecimiento: EGF, FGF, TNF- $\alpha$  y TGF- $\alpha$ , principalmente involucrados en la proliferación y diferenciación del EO y otros como el TGF- $\beta$ , involucrado en la inhibición del crecimiento. Las células del EO en cultivo secretan citocinas bioactivas como la IL-1 y la IL-6, las cuales tienen efectos reguladores sobre el crecimiento, diferenciación celular, ovulación y distribución de las células intraováricas del sistema inmune. Este

epitelio expresa también varios tipos de queratinas y produce enzimas proteolíticas, (para ver revisiones: Auersperg et al., 2001; Murdoch & Gottsch, 2003). Todas estas proteínas en concierto, promueven la ruptura del ovario durante la ovulación y su posterior regeneración para cerrar la marca que dejó la salida del óvulo, (Murdoch et al., 2001).

## **I.8 REGULACIÓN DE LA FOLICULOGÉNESIS POR TRANSMISORES**

Además de los factores discutidos anteriormente que participan en la foliculogénesis se encuentran los neurotransmisores (NT), otro grupo que podrían estar involucrados en este proceso.

Los ovarios de humanos y de otros primates están inervados por neuronas simpáticas y sensoriales del sistema nervioso periférico y se ha demostrado la presencia de receptores muscarínicos sobre las CG de humano que están relacionados con un incremento en los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular, pero no con la producción de esteroides. Los RNAs mensajeros (RNAm) que codifican para los receptores muscarínicos MR1, MR3 y MR5 han sido detectados en ovarios de humanos y monos adultos su distribución es específica; los ovocitos expresan exclusivamente el subtipo MR3, mientras que las CG expresan los receptores MR1 y MR5. También se ha identificado la presencia de precursores de la síntesis del neurotransmisor ACh en las CG lo que sugiere un mecanismo de regulación parácrino/autócrino (Fritz et al., 1999).

Además, se ha demostrado que en los ovocitos de primates se encuentra la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (DBH), una de las enzimas involucradas en la síntesis de la norepinefrina (NE), pero no la hidroxilasa de tirosina (TH), sugiriendo que si los ovocitos producen NE, su precursor que es la dopamina (DA) puede ser de una fuente externa, ya que al parecer son incapaces de sintetizarla. Además folículos aislados, responden a la DA elevando los niveles de AMPc. Ello sugiere que señales neuronales tanto extrínsecas como intrínsecas del ovario están involucradas en regular el desarrollo de la homeostasis folicular (Mayerhofer, et al., 1998).

También, la posible participación en la foliculogénesis de otros neurotransmisores como las sustancias purinérgicas es sugerida a través de múltiples evidencias. Por ejemplo, utilizando diferentes agentes que inhiben o estimulan las diferentes rutas de síntesis de las purinas (la ruta de síntesis de novo o

la ruta de rescate de nucleótidos) se han obtenido evidencias de que estas moléculas pueden participar en la maduración meiótica inducida por FSH (Downs, 1997). Diferentes sustancias purinérgicas han sido identificadas en el líquido folicular (Eppig et al., 1985)

Además, se ha demostrado a través de estudios electrofisiológicos que en el complejo ovocito-células del cumulus de ratón, el ATP genera al menos dos corrientes iónicas dependientes de la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> (Arellano et al., 2002). En el mismo modelo, se ha observado que el ATP induce la movilización de Ca<sup>2+</sup> en las células del cumulus y la onda de incremento de Ca<sup>2+</sup> se propaga al ovocito a través de las uniones comunicantes (Webb et al., 2002). Asimismo, se ha observado que en células de la granulosa en cultivo el ATP activa a la proteína Cinasa C (Tai et al., 2001<sup>a</sup>) y la vía de la cinasa p42-p44 activada por mitógeno (Tai et al., 2001<sup>b</sup>).

Actualmente nuestro laboratorio cuenta con evidencias obtenidas empleando técnicas de biología molecular, de la expresión de receptores P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> y de todos los receptores P2X en las CG.

Otro posible papel de estos receptores en la foliculogénesis fue propuesto a partir de estudios que demuestran que el ATP extracelular puede inducir apoptosis en las CGh (Park et al., 2003). Además este estudio demostró que la HGCh (Hormona Gonadotropica Coriónica humana) tiene un efecto protector para impedir que el ATP provocara apoptosis en las CGh. Este estudio sugiere que tanto los receptores P2X como P2Y están involucrados en el proceso apoptótico, que como ya se mencionó, es un evento esencial durante la foliculogénesis. También, datos obtenidos en el laboratorio empleando células de la teca de porcino en cultivo tratadas a concentraciones que activan al receptor P2X<sub>7</sub>, muestran que el ATP induce la apoptosis de este tipo celular. Ensayos de western blot, y de RT-PCR permitieron corroborar la expresión del receptor P2X<sub>7</sub> en este tipo celular. Este mecanismo de muerte celular inducido por ATP podría ser relevante durante el desarrollo folicular (Vázquez-Cuevas et al., 2006).

## **II. JUSTIFICACIÓN**

Con los estudios que ya se describieron en este trabajo, donde se muestran claras evidencias en la identificación tanto de sustancias purinérgicas como de receptores purinérgicos funcionales en el ovario, se puede deducir que el ATP y el UTP extracelulares pueden activar diversos receptores P2 y estos a su vez, activar diferentes vías de transducción de señales que podrían inducir cambios en las células que componen a los ovarios (CG, CT, ovocito, células del intersticio), y de esa manera modular el proceso de foliculogénesis.

Una manera de aportar más información sobre el papel funcional de estos receptores sería determinar la distribución de su expresión en diferentes etapas de la foliculogénesis durante el ciclo estral.

## **III. HIPÓTESIS**

Receptores purinérgicos del tipo P2X, así como P2Y2, son expresados de manera diferencial en ovarios de ratón dependiendo de la maduración folicular y del tipo celular.

## **IV. OBJETIVOS**

1. Determinar el patrón de expresión de los receptores P2X y P2Y2 durante la foliculogénesis.
2. Correlacionar esta expresión con las diferentes etapas del ciclo estral.

## **V. MATERIAL Y MÉTODOS**

Las ratonas utilizadas fueron de la cepa C57black de alrededor de tres meses de edad. Se les realizó un exudado vaginal para identificar la etapa estral en la que se encontraban. Las muestras se colocaron en portaobjetos y se tiñeron con hematoxilina y eosina de la siguiente manera: se dejaron en xileno por 5 min, alcohol absoluto 3 min, alcohol al 96% 3 min, alcohol al 80% por 3 min, agua destilada 10 min, hematoxilina 20 seg, agua destilada 10 min, solución diferenciadora (50 ml de agua y 15 $\mu$ l de hidróxido de amonio), agua destilada 10 min, alcohol al 80% 1 min, eosina 1 min, alcohol al 96% 3 min, alcohol absoluto 3 min y xileno 3 min. Al final se deja con una capa de permount (Fisher Scientific, SP15-500), para fijar la muestra por tiempo indefinido. Las láminas fueron observadas en microscopio de campo claro.

### **V.1. GELATINIZACIÓN DE PORTAOBJETOS.**

En 100 ml de agua destilada se colocaron 2 g de gelatina y se dejaron alrededor de 4 horas para que se hidratara. Aparte en 140 ml de agua destilada se disolvieron 0.2 g de cromoalúmina y se calentaron entre 40°C y 60°C. Después se adiciona la gelatina previamente hidratada, manteniendo tibia la solución hasta que se disolviera la gelatina. Se adicionaron 160 ml de etanol y se mezcló bien.

Por otra parte, los portaobjetos fueron tratados 24 horas antes con etanol absoluto y se limpio cada uno con una gasa. Después fueron colocados en una canastilla y se sumergieron en la solución de la gelatina con cromoalúmina, durante 3 min, manteniéndolos en movimiento durante este tiempo. Se escurrieron y se dejaron secar por 24 horas. Pasado este tiempo se volvieron a sumergir durante otros 3 min moviéndolos ligeramente mientras transcurre ese tiempo. Se escurrieron para quitar el exceso de solución y se dejaron secar durante 24 horas. Se almacenaron a temperatura ambiente.

## **V.2 DISECCIÓN DE OVARIOS**

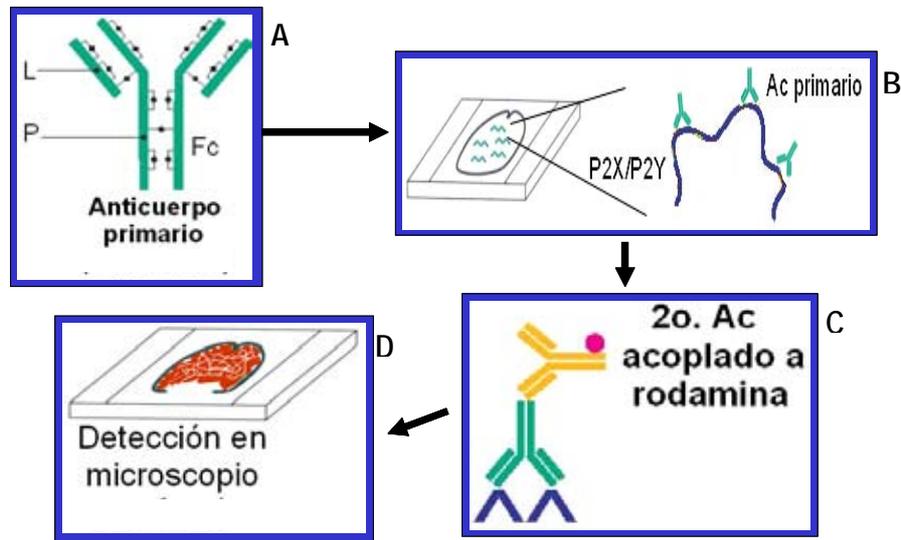
Las ratonas fueron anestesiadas con cloroformo y perfundidas transcárdiacamente con PBS 1X (142mM NaCl, 1.8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.6mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7.4) y después con paraformaldehído (PFA) al 4% (Sigma, P-6148) en PBS 1X. Se disecaron los ovarios y fueron limpiados para quitar grasa y el exceso de tejidos conectivos, después se dejaron 4 horas mínimo en PFA al 4% en PBS 1X a temperatura ambiente y se dejaron toda la noche en solución de PBS 1X con 30% de sacarosa a 4°C.

Al día siguiente cada ovario se colocó en Jun Tissue freezing medium (Leica, No. Cat. 020108926) y se congelaron a -20°C para después ser seccionados en cortes secuéniales de 10µm en un crióstato (Leica CM1850).

Los cortes se recolectaron en portaobjetos gelatinizados como se describió anteriormente. Esos cortes fueron almacenados a -80°C.

## **V.3 INMUNOHISTOQUÍMICA**

La técnica de inmunohistoquímica consiste en detectar la presencia de un péptido o proteína en una célula o tejido, utilizando un anticuerpo (monoclonal o policlonal, IgG o IgM) específico contra él. La técnica esta basada en la reacción antígeno-anticuerpo y por ello el anticuerpo primario que se utiliza debe ser generado en una especie diferente a la que se está estudiando. Existen dos tipos de métodos inmunohistoquímicos: directo e indirecto. Para este trabajo se empleo el método indirecto, en este la señal del anticuerpo se amplifica con la incubación de anticuerpos secundarios acoplados a un marcador, en este caso se utilizaron dos marcadores fluorescentes: rodamina o FITC, que al ser excitados dan un una fluorescencia roja o verde, respectivamente. Este método nos permite identificar la localización de las proteínas en un tejido en particular (figura 8).



**Figura 8.** Esquema de la técnica de inmunohistoquímica. A) Representación de un anticuerpo (Ac) primario, con sus cadenas ligeras (L), sus cadenas pesadas (P) y un sitio conservado (Fc). B) El Ac primario reconoce a la proteína, ya sean receptores P2X o P2Y. C) Proteína, específicamente en este caso receptores purinérgicos (azul), Ac primario que reconoce a las proteínas anteriores y por último un Ac secundario (verde) acoplado a rodamina (rosa) que reconoce a su vez al Ac primario. D) El microscopio de fluorescencia excita a la rodamina y permite observar una fluorescencia roja en el tejido que expresa receptores purinérgicos.

Los tejidos congelados, se dejaron un mínimo de una hora a temperatura ambiente. Después se fijaron con PFA 4% en PBS por 7 minutos y se realizaron 2 lavados de PBS 1X, 3 minutos cada uno. Después se bloqueó con suero de cabra normal (SNC) al 4% en PBS (solución bloqueadora = SB) por espacio de una hora y luego se lavaron dos veces con PBS 1X, 3 minutos.

Los tejidos fueron incubados toda la noche a 4°C con anticuerpos policlonales de conejo para los purinoreceptores: P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub> (Chemicon, reconoce del aminoácido 383 al 397 del carboxilo terminal), P2X<sub>4</sub> (Chemicon y Alomone, reconoce parte del carboxilo terminal del aminoácido 370 al 388), P2X<sub>5</sub> y P2X<sub>6</sub> (Santa Cruz), P2X<sub>7</sub> (Alomone y Santa Cruz, reconocen parte del carboxilo terminal del aminoácido 576 al 595) y P2Y<sub>2</sub> (Chemicon). Los anticuerpos fueron diluidos (1:200) en SB. En los controles negativos el anticuerpo primario fue omitido y reemplazado por SB. Se dejó toda la noche en una cámara húmeda a 4°C.

Al día siguiente, los tejidos fueron lavados 3 veces con PBS 1X 3 minutos y posteriormente incubados con un segundo anticuerpo de cabra anti-conejo acoplado a rodamina (IgG-R) en una dilución 1:200 por una hora a temperatura ambiente y en oscuridad, luego se retiró el exceso y se lavó 3 veces con PBS 1X 3 minutos. Las

muestras fueron observadas en un microscopio de fluorescencia el mismo día en que se realizó la segunda incubación (IgG-R). El tiempo de excitación para las muestras variaba de 2.5 seg a 3 seg, para el control la exposición fue de 6 seg.

Para cada subtipo de receptor purinérgico se utilizaron dos ratonas por cada etapa del ciclo estral.

Para las colocalizaciones de P2X<sub>4</sub> y P2X<sub>7</sub> con el epitelio de ovario o con las células de la teca, la segunda incubación con el anticuerpo secundario acoplado a rodamina (1:200) se dejó por media hora a 37°C y posteriormente se incubó con el anticuerpo monoclonal TROMA-1 (University of Iowa) específico del epitelio de ovario o para las células de la teca P450 ssc (Chemicon). Posteriormente se realizó una tercera incubación con otro segundo anticuerpo que reconociera a TROMA-1 o a P450 ssc, acoplado a fluoresceína. Ese mismo día se hicieron los lavados con PBS.

La cuarta incubación fue con anticuerpos secundarios que reconocieran a los anticuerpos anteriores, estos estaban acoplados a fluoresceína ya que la segunda incubación con los anticuerpos secundarios que reconocían a P2X<sub>4</sub> y P2X<sub>7</sub> estaban acoplados a la rodamina.

Para mantener la fluorescencia de los segundos anticuerpos, se cubrieron las láminas con DABCO (SIGMA, 1, 4-Diazabicyclo [2.2.2] octane, D-2522) y un cubreobjeto para ser visualizado en el microscopio de fluorescencia.

Las imágenes obtenidas fueron analizadas en Adobe Photoshop versión 7.

## **VI. RESULTADOS**

### **VI. INMUNODETECCIÓN DE RECEPTORES P2 EN OVARIO**

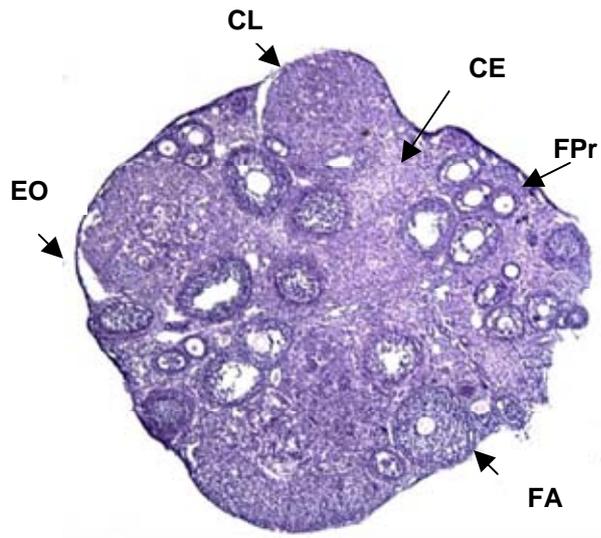
La determinación de los subtipos de receptores purinérgicos P2 (P2X<sub>1-7</sub> y P2Y<sub>2</sub>) en ovarios de ratón se obtuvo por medio de inmunohistoquímicas, con anticuerpos policlonales dirigidos contra estos receptores, así como de anticuerpos específicos para dos tipos celulares en particular: células de la teca y epitelio ovárico.

Los controles que se emplearon para corroborar que los anticuerpos estaban reconociendo a los diferentes receptores P2 fueron hechos en cortes de cerebelo, ya que la mayoría de estos receptores han sido encontrados en cerebro (Hervás et al., 2003; Deuchars et al., 2001; Rubio & Soto, 2001).

#### **VI.1 OVARIOS TRATADOS CON HEMATOXILINA Y EOSINA**

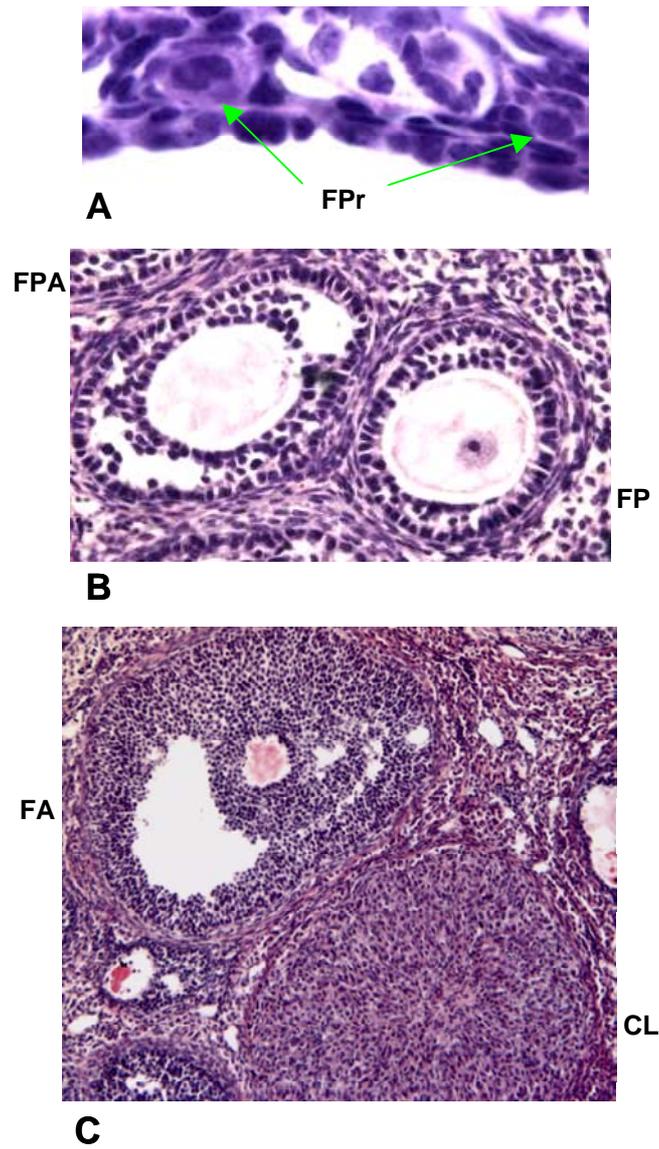
Antes de iniciar la detección de los receptores correspondientes se realizaron tinciones de hematoxilina y eosina sobre cortes de ovario para identificar la anatomía del mismo, las muestras fueron observadas en microscopio de campo claro.

La imagen 9 muestra un corte de ovario de 10µm, en la que se alcanzan a apreciar diferentes folículos en varias etapas, inclusive desde los primordiales (ovocito rodeado de una sola capa de CG cuboidales) (1) hasta folículos antrales, que corresponde a la última etapa de desarrollo antes de ser ovulados (2). También se logran apreciar algunos cuerpos lúteos, que se distinguen fácilmente por su gran tamaño (3), las células del estroma (4) que son las que separan a cada uno de los folículos, cuerpos lúteos y al epitelio ovárico (EO), este último tiene la característica de formar una monocapa que envuelve a todo el ovario.



**Fig 9.** Histología de un corte de ovario de 10 $\mu$ m en campo claro, teñido con hematoxilina y eosina (4X). (1)folículo primordial (FPr), (2) folículo antral (FA), (3) cuerpo lúteo (CL), (4) células del estroma (CE), (5) epitelio ovárico (EO).

Para poder distinguir mejor las estructuras de cada uno de los folículos con esta tinción, se obtuvieron imágenes a un mayor aumento donde se puede apreciar la morfología de cada folículo en sus diferentes etapas. En la figura 10A se muestra la fotografía de una región del ovario donde se pueden distinguir dos folículos primordiales rodeados de sus CG cuboidales. Como se puede observar la mayoría de los folículos en etapas tempranas se encuentran en la periferia del ovario y siempre están cerca del EO. La figura 10B es la fotografía de folículos primarios (FP) y preantrales (FPA), en donde se puede observar como el ovocito alcanza un tamaño mayor. Comienza un incremento en el número de las CG, así como la diferenciación de las CT, las cuales empiezan a rodear al ovocito. La figura 10C muestra un folículo antral (FA), en donde se distingue muy bien el antro, el ovocito rodeado de sus células del cumulus y se distinguen varias capas de las CT, alargadas y planas rodeando al folículo mientras que las CG son redondas, más abundantes y rodean tanto al folículo como al líquido antral; en la misma imagen se muestra un cuerpo lúteo (CL).



---

**Fig 10.** Cortes de ovario de 10 $\mu$ m en campo claro, teñidos con hematoxilina y eosina. A) folículos primordiales (FPr). B) folículos preantral (FPA) y primario (FP). C) folículo antral (FA) y un cuerpo lúteo (CL).

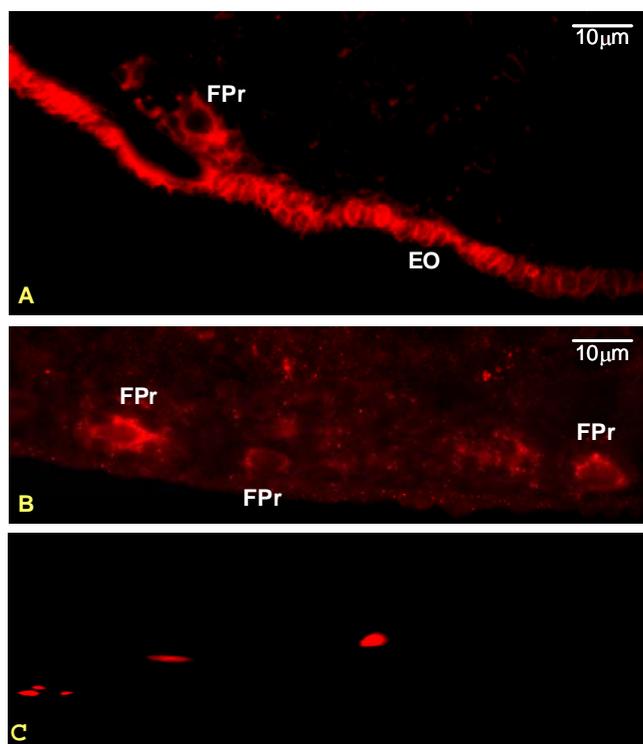
---

## VI.2 IDENTIFICACIÓN DE RECEPTORES PURINÉRGICOS P2X<sub>1</sub> EN OVARIO

Una vez identificadas las características morfológicas de los folículos ováricos, se procedió a estudiar el patrón de expresión de los receptores purinérgicos P2X por inmunohistoquímica en cortes de ovario.

Para todos los ensayos en la identificación de los receptores P2X, se emplearon controles en los cuales se omitió la incubación con el primer anticuerpo y solo se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a rodamina para descartar que este anticuerpo se estuviera uniendo inespecíficamente a otras proteínas del tejido.

En la figura 11 se muestran imágenes obtenidas con un microscopio de fluorescencia de cortes tratados con el anticuerpo anti-P2X<sub>1</sub> y después incubadas con un anticuerpo secundario acoplado a rodamina. La figura 11A muestra la imagen de un segmento en la periferia del ovario donde se distingue la marca del anticuerpo del EO. En esta fotografía también se observa un FPr que como los mostrados en la figura 11B presenta una expresión abundante de este receptor en la membrana del ovocito.



**Fig 11.** Localización de receptores purinérgicos P2X<sub>1</sub> en ovarios de ratón. A y B) Los cortes fueron incubados con un anticuerpo anti-P2X<sub>1</sub> e incubado con un segundo anticuerpo acoplado a rodamina, C) Control, incubando el tejido solo con el segundo anticuerpo y con doble tiempo de exposición.

Al analizar otras zonas del ovario, se encontró que este anticuerpo marca también vasos sanguíneos (VS) tal como se aprecia en las figuras 12A y 12B.

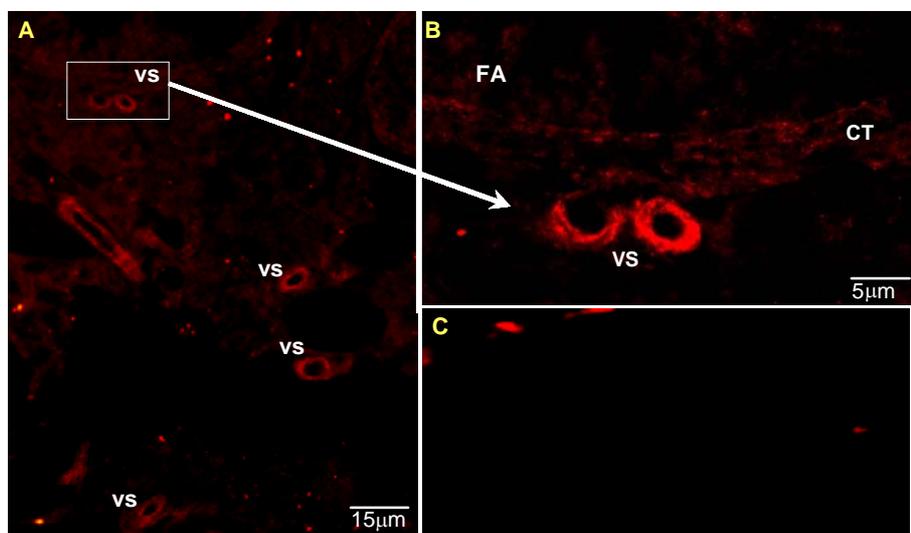


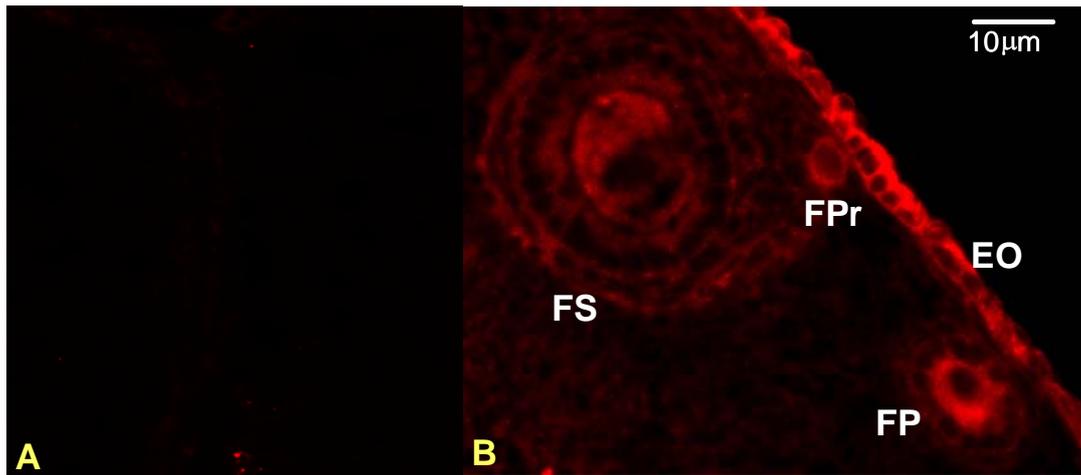
Fig 12. Localización de receptores purinérgicos P2X<sub>1</sub> en vasos sanguíneos en el ovario. A) Cortes de ovario donde se distinguen vasos sanguíneos (20X). B) Amplificación de la imagen A (100X). C) Control, solamente incubado con el anticuerpo secundario acoplado a rodamina y con doble tiempo de exposición.

### VI.3 IDENTIFICACIÓN DE RECEPTORES PURINÉRGICOS P2X<sub>4</sub> EN OVARIO

Para la identificación de receptores P2X<sub>4</sub> se procedió metodológicamente como con la identificación de los P2X<sub>1</sub>.

La figura 13A muestra la fotografía de una muestra control, donde no se observa ninguna fluorescencia lo que indica que el anticuerpo secundario es específico en el reconocimiento del anticuerpo primario (anti-P2X<sub>4</sub>). La figura 13B muestra una fotografía (40X) de un corte de ovario similar al de la foto 13A incubado con el anticuerpo dirigido contra el receptor P2X<sub>4</sub> y un anticuerpo secundario acoplado a rodamina. En la imagen se observa una marca muy importante en el EO, y una marca de menor intensidad en los FPr, en ovocitos y en las CG de los FP y de los FS. Aunque también se alcanza a observar una ligera inmunoreactividad en las células del estroma.

La marca de los anticuerpos se observan en la membrana de las células así como en la región citoplasmática, este patrón se repite en casi todos los resultados que se presentan en este trabajo.



**Fig 13.** Localización de receptores P2X<sub>4</sub> empleando inmunohistoquímica en cortes de ovario. A) Control, solamente incubado con el anticuerpo secundario acoplado a rodamina. B) Muestra incubada con anticuerpo anti-P2X<sub>4</sub> y posteriormente con un segundo anticuerpo acoplado a rodamina. EO=epitelio ovárico, FPr= folículo primordial, FP=folículo primario y FS=folículo secundario.

Con el fin de analizar con más detalle la distribución del marcaje, se obtuvieron fotografías a una mayor amplificación. En la figura 14, 15 y 16 se muestran las fotografías obtenidas en estas condiciones. Como se puede apreciar en la figura 14A donde se hizo una amplificación a nivel del EO, la inmunoreactividad es muy evidente solamente en la membrana de las células de este epitelio. La figura 14B, muestra una región del ovario en donde se aprecian varios FPr. Los FPr siempre aparecen en grupos cercanos al EO. La distribución de la marca sobre estos folículos sugiere que los receptores P2X<sub>4</sub> se localizan en la membrana del ovocito y/o en la membrana de las CG que en este momento del desarrollo del folículo son planas. En la figura 15, donde se muestra más amplificada la imagen de un FPr muy próximo al EO, se vuelve a apreciar la distribución de estos receptores sobre la membrana de las células del EO y alrededor del ovocito del FPr. Sin embargo es difícil determinar si la marca también se distribuye sobre las células de la granulosa, las cuales se observan claramente sobre el corte teñido con eosina-hematoxilina (figura 15B). Este patrón se repite en todas las muestras y regiones donde se encuentra el EO y los FPr.

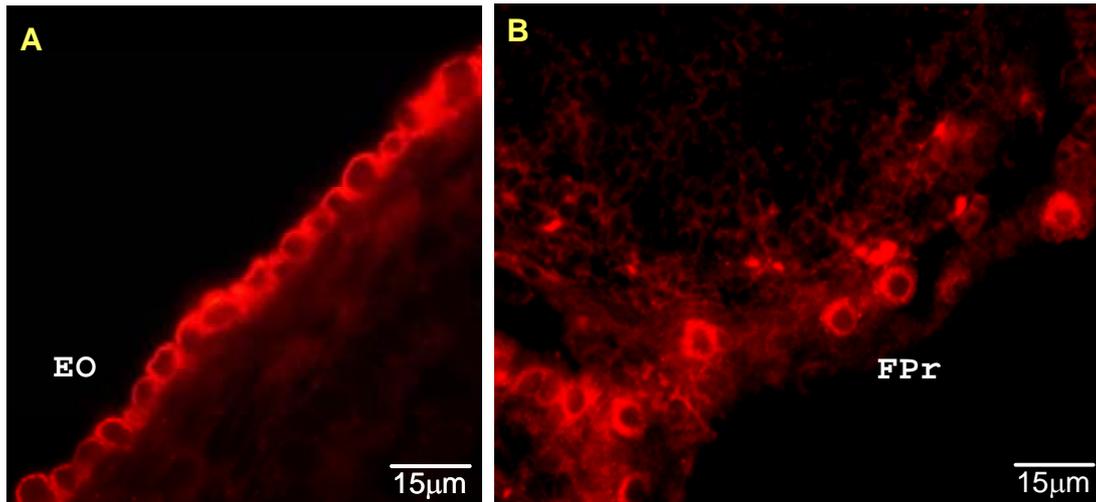


Fig 14. Amplificación de algunas regiones del ovario para identificar la localización celular de los receptores P2X<sub>4</sub>. A) Amplificación de la región del EO. B) Amplificación de FPr. Las imágenes fueron amplificadas al doble con el programa AdobePhotoshop versión 7.0.

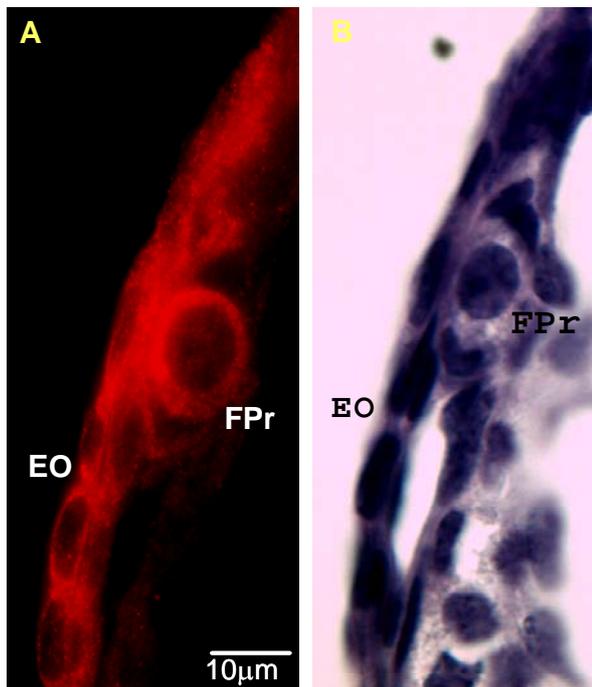


Fig 15. Amplificación del EO y FPr. A) Corte marcado con un anticuerpo anti P2X<sub>4</sub> y un segundo anticuerpo acoplado a rodamina. B) tinción con hematoxilina y eosina de la misma muestra.

Con respecto a los FP, también se obtuvieron imágenes amplificadas de regiones donde se apreciaban estas estructuras. En la figura 16 se observan dos FPr y un FP. La localización de los receptores P2X<sub>4</sub> en los FP se ubica sobre los ovocitos y a diferencia de lo que ocurre con los FPr, la monocapa de las CG que en este estadio son cuboidales, se marca perfectamente.

En este estudio también se analizó la distribución de los receptores sobre folículos en etapas más avanzadas del desarrollo, y se observó que los ovocitos de folículos preantrales y antrales no presentan marca alguna, aunque las CG de todos los folículos se marcan ligeramente (datos no mostrados).

En resumen, las evidencias obtenidas por inmunohistoquímica en relación a la distribución de los receptores P2X<sub>4</sub> sobre cortes de ovario de ratón muestran que los receptores P2X<sub>4</sub> se expresan en los folículos a partir de etapas muy tempranas de la foliculogénesis. Sin embargo, la densidad de estos receptores disminuye sobre la membrana de los ovocitos a medida que estos avanzan en su desarrollo, siendo imperceptible en los ovocitos de los folículos preantrales y antrales. En el EO, estos receptores son muy abundantes.

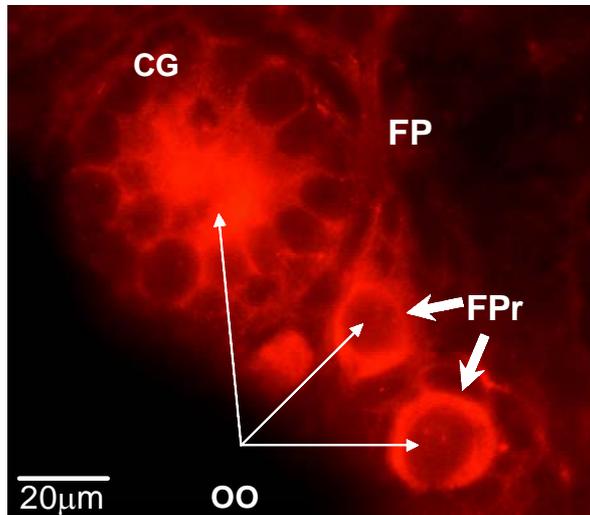
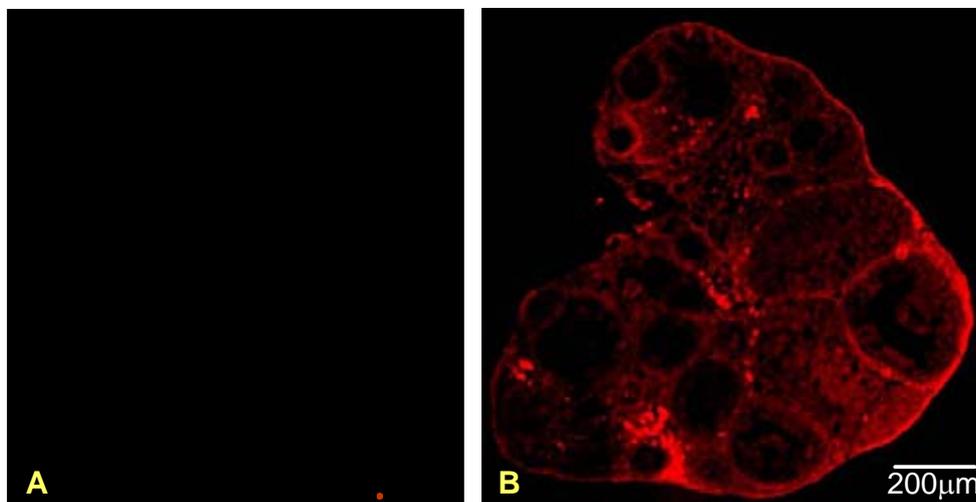


Fig 16. Amplificación de FP y FPr, expresando receptores purinérgicos P2X<sub>4</sub> en sus ovocitos (OO) y CG.

#### VI.4 IDENTIFICACIÓN DE RECEPTORES PURINÉRGICOS P2X<sub>7</sub> EN OVARIO

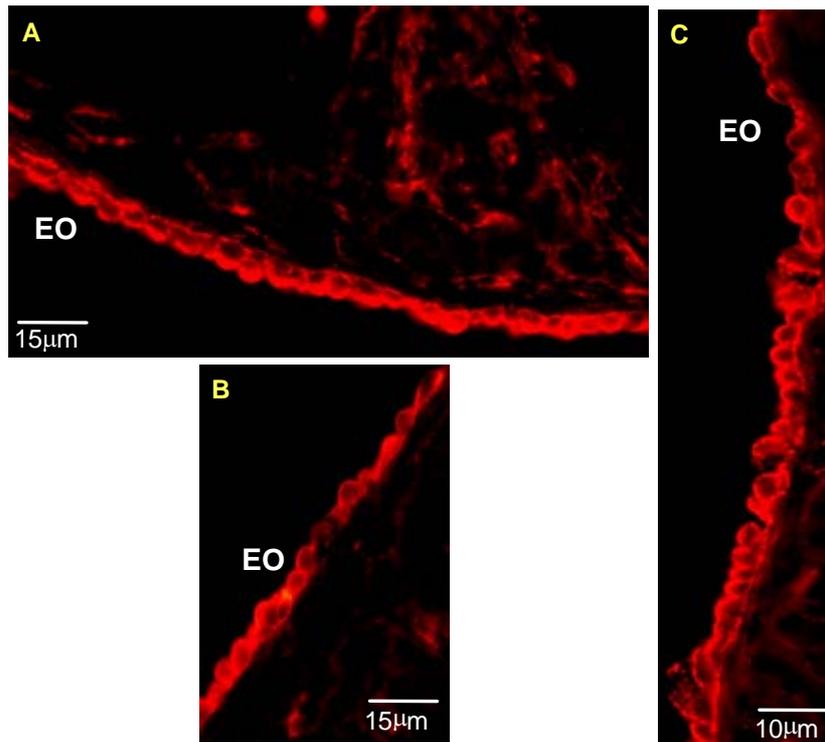
En la figura 17 se observa el patrón de marcaje de cortes de ovario con al anticuerpo anti P2X<sub>7</sub>.

En la figura 17A, se observa el control donde no se distingue ninguna marca, lo que indica que el anticuerpo secundario reconoce de manera específica al anticuerpo primario. En la figura 17B se muestra la fotografía de un corte de ovario incubado con el anticuerpo anti P2X<sub>7</sub> y donde se observa que los receptores P2X<sub>7</sub> se distribuyen principalmente sobre el contorno del ovario y sobre los folículos en etapas avanzadas de la foliculogénesis.



**Fig 17.** Identificación de receptores purinérgicos P2X<sub>7</sub> en ovarios de ratón. A) Control, solo se incubó con el segundo anticuerpo acoplado a rodamina, B) Cortes de ovario incubado con un primer anticuerpo dirigido contra el receptor P2X<sub>7</sub> e incubado con un segundo anticuerpo acoplado a rodamina. Las imágenes fueron tomadas a 4X.

Para poder identificar mejor las diferentes estructuras donde se distribuye la marca, se tomaron imágenes amplificadas de diferentes zonas del ovario. En la figura 18 se muestra la fotografía del EO y donde se puede observar que todo el epitelio expresa este receptor de manera muy abundante y exclusiva sobre la membrana celular independientemente de las características estructurales de las células (compare A, B y C).



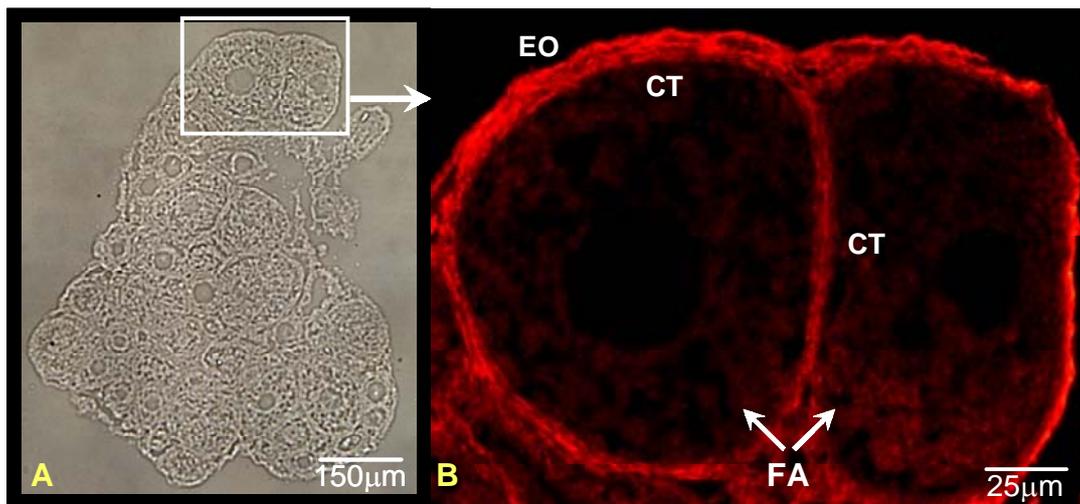
---

**Fig 18.** Identificación por inmunohistoquímica de receptores purinérgicos P2X<sub>7</sub> en ovarios de ratón. A,B y C) Los cortes fueron incubados con un primer anticuerpo dirigido contra el receptor P2X<sub>7</sub> e incubados con un segundo anticuerpo acoplado a rodamina.

---

Por otra parte y con el fin de estudiar con más detalle la distribución de estos receptores sobre los folículos se obtuvieron imágenes a diferentes ampliaciones, en donde estos folículos eran evidentes (figura 19 y 20).

La figura 19A muestra una imagen de un corte de ovario completo, donde se pueden observar varios folículos en diferentes etapas de desarrollo. En el recuadro se muestran dos folículos en etapa antral y en la figura 19 los mismos folículos observados con un microscopio de fluorescencia con una ampliación. Como se observa, el marcaje para el receptor P2X<sub>7</sub>, se ubica preferentemente en el EO y en las CT, aunque también se distingue marca en algunas CG pero la intensidad de la fluorescencia es menor.

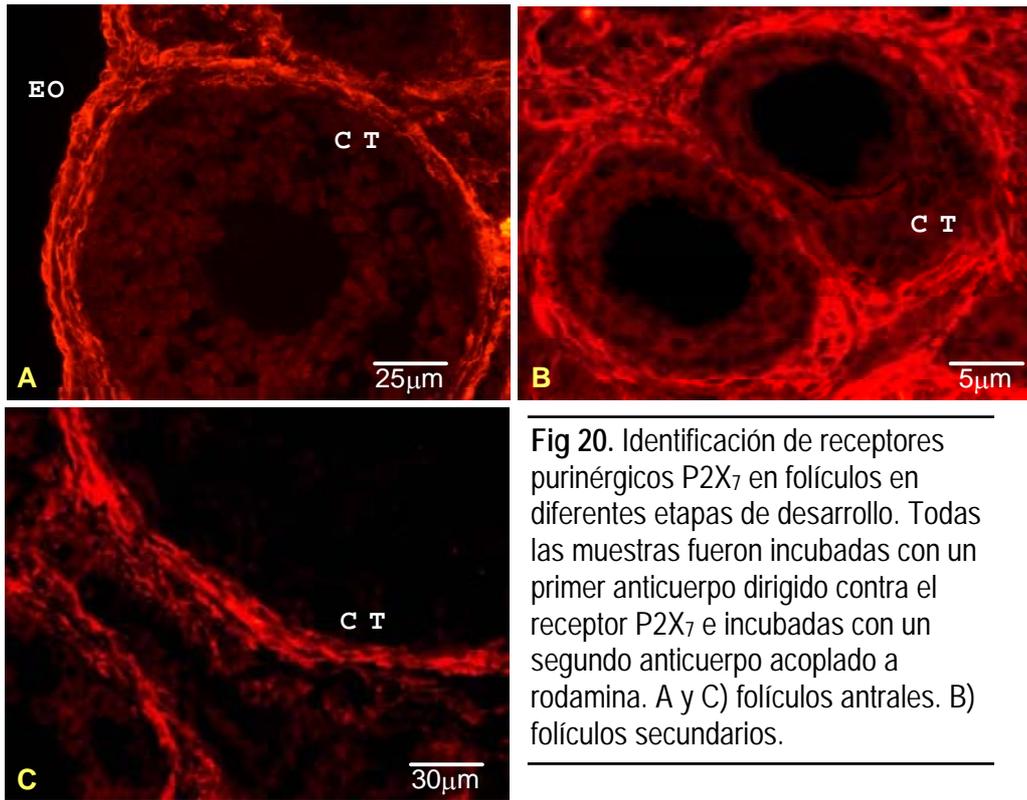


**Fig 19.** Identificación de receptores purinérgicos P2X<sub>7</sub> en folículos antrales (FA). A) Cortes de ovario completo en campo claro, en donde se muestran en el recuadro dos folículos antrales B) La imagen del recuadro es una muestra incubada con un anticuerpo anti-P2X<sub>7</sub> y con un segundo anticuerpo acoplado a rodamina.

Las figuras 20A y 20C muestran la distribución de los receptores P2X<sub>7</sub> sobre folículos antrales, la figura 20B representa algunos folículos secundarios. Como se puede observar, la marca se localiza preferencialmente en los límites de los folículos, es decir en el lugar donde se sitúan las células de la teca. También se puede observar un marcaje ligero sobre las CG y sobre las células del estroma. Con respecto al ovocito, no se observa ninguna marca sobre estas células independientemente de la etapa de desarrollo del folículo. Los folículos primarios presentaban una marca muy baja, debido quizá a que en estas etapas apenas comienzan a formarse las CT (datos no mostrados).

En este estudio se trató de identificar también la expresión de los receptores P2X<sub>7</sub> sobre los folículos en las primeras etapas de desarrollo y no se pudo distinguir ningún marcaje en ningún tipo celular.

Estas imágenes mostraron tres tipos celulares que expresan receptores purinérgicos del tipo P2X<sub>7</sub>: el EO >las CT > y las CG. Este marcaje se observa desde folículos secundarios hasta folículos antrales.



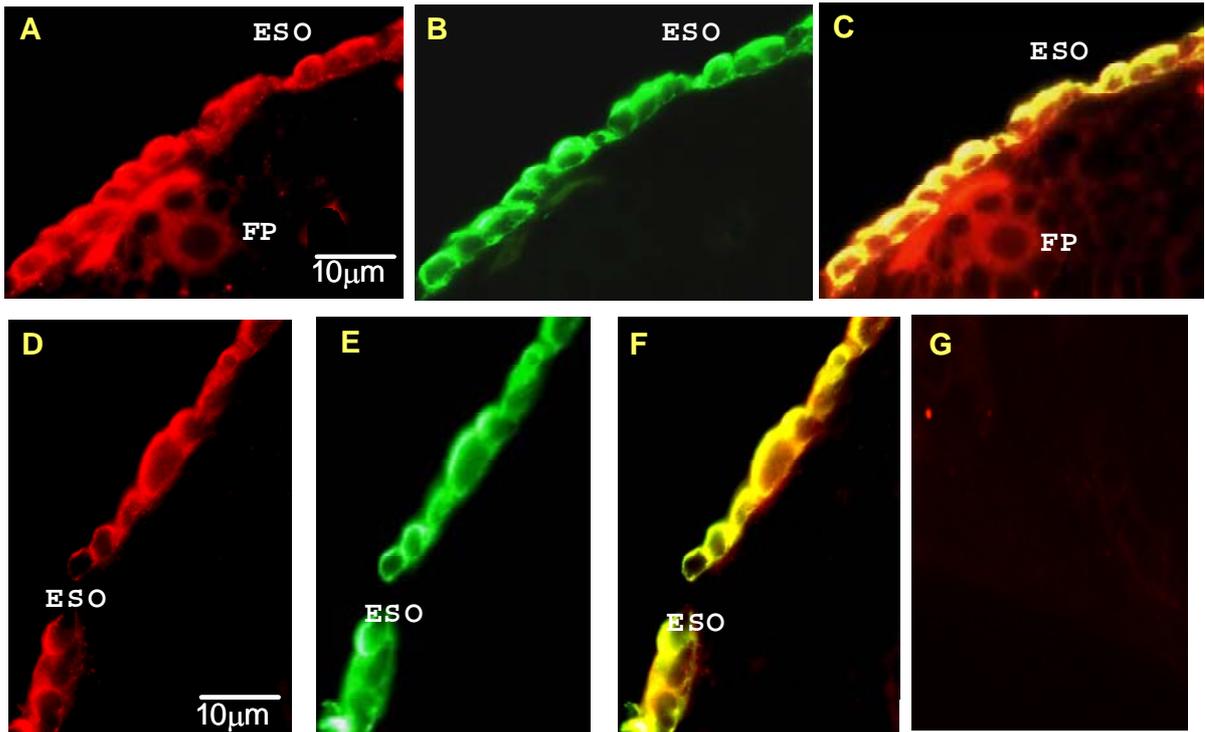
**Fig 20.** Identificación de receptores purinérgicos P2X<sub>7</sub> en folículos en diferentes etapas de desarrollo. Todas las muestras fueron incubadas con un primer anticuerpo dirigido contra el receptor P2X<sub>7</sub> e incubadas con un segundo anticuerpo acoplado a rodamina. A y C) folículos antrales. B) folículos secundarios.

En este estudio se analizaron varios cortes de ovario provenientes de diferentes animales en diferentes estadios del ciclo estral encontrando consistentemente los mismos resultados. La expresión de los receptores purinérgicos P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>4</sub> y P2X<sub>7</sub> no muestran ninguna diferencia en el patrón del marcaje entre las cuatro etapas del ciclo estral (diestro, proestro, estro y metaestro), y esto podría sugerir que la expresión de los receptores no está siendo regulada por las hormonas gonadotrópicas FSH y LH.

## **VI.5 CO-LOCALIZACIÓN DE RECEPTORES PURINÉRGICOS P2X<sub>4</sub> Y P2X<sub>7</sub> CON LA CITOQUERATINA ENDO-A EN EL EPITELIO OVÁRICO.**

Para corroborar la identidad de las células que expresan receptores P2X<sub>4</sub> y P2X<sub>7</sub> se realizaron ensayos de co-localización por inmunohistoquímica empleando anticuerpos específicos contra los receptores P2X<sub>7</sub> y P2X<sub>4</sub> y otros que marcan a las células del EO o a las CT, como se describió en Material y Métodos. El anticuerpo empleado para marcar el EO fue TROMA-1 dirigido contra la citoqueratina Endo-A, una proteína del citoesqueleto que solo es expresado en el epitelio ovárico. El anticuerpo empleado para marcar a las células de la teca fue el anti-P450scc que reconoce a la enzima P450scc que se encuentra en el citoplasma de las CT. Como anticuerpos secundarios se emplearon dos, uno acoplado a rodamina y otro acoplado a fluoresceína.

Los resultados que se obtuvieron con los anticuerpos anti-P2X<sub>4</sub> y TROMA-1 se muestran en la figura 21. En esta figura se observan dos segmentos de dos ovarios diferentes donde se localiza el EO. En las figuras 21A y 21D se muestra la expresión de los receptores P2X<sub>4</sub> (en rojo) y en las figuras 20B y 20E la expresión de la citoqueratina Endo-A (en verde). Las figuras 21C y 21F fueron obtenidas a través del empalme de las imágenes A-B y D-E respectivamente. Como se aprecia, al hacer el empalme la fluorescencia observada es amarilla lo que indica que ambos anticuerpos marcan el mismo tipo celular y que su expresión co-localiza. Estos resultados permiten confirmar que el receptor P2X<sub>4</sub> esta expresándose en el EO.



**Fig 21.** Inmunohistoquímica con doble marcaje en cortes de ovario de ratón. A y D) Marcaje con el anticuerpo anti-P2X<sub>4</sub> (anticuerpo secundario acoplado a rodamina - fluorescencia roja). B y E) Marcaje con el anticuerpo TROMA-1 (anticuerpo secundario acoplado a FITC - fluorescencia verde). C ) muestra a las imágenes A y B sobrepuestas y F) las mágenes D y E sobrepuestas. La localización de ambas proteínas (P2X<sub>4</sub> y citoqueratina) en un mismo tipo celular, se demuestra con la combinación de ambos fluoróforos resultando una fluorescencia amarilla (C y F). G) Representa un control incubado con dos segundos anticuerpos acoplados a rodamina y a FITC, respectivamente.

Para la co-localización de los receptores P2X<sub>7</sub> y la citoqueratina endoA se siguió el mismo procedimiento que para los receptores P2X<sub>4</sub>, y los resultados son mostrados en la figura 22. En las figuras 22A y D se observa el marcaje con el anticuerpo anti-P2X<sub>7</sub>, en las figuras 22B y E el marcaje con TROMA-1 y en C y F la co-localización a través del empalme de las imágenes A–B y D-E respectivamente. Las imágenes muestran claramente que el EO se marca con los dos anticuerpos y además ambas marcas co-localizan lo que confirma que el EO expresa receptores P2X<sub>7</sub>.

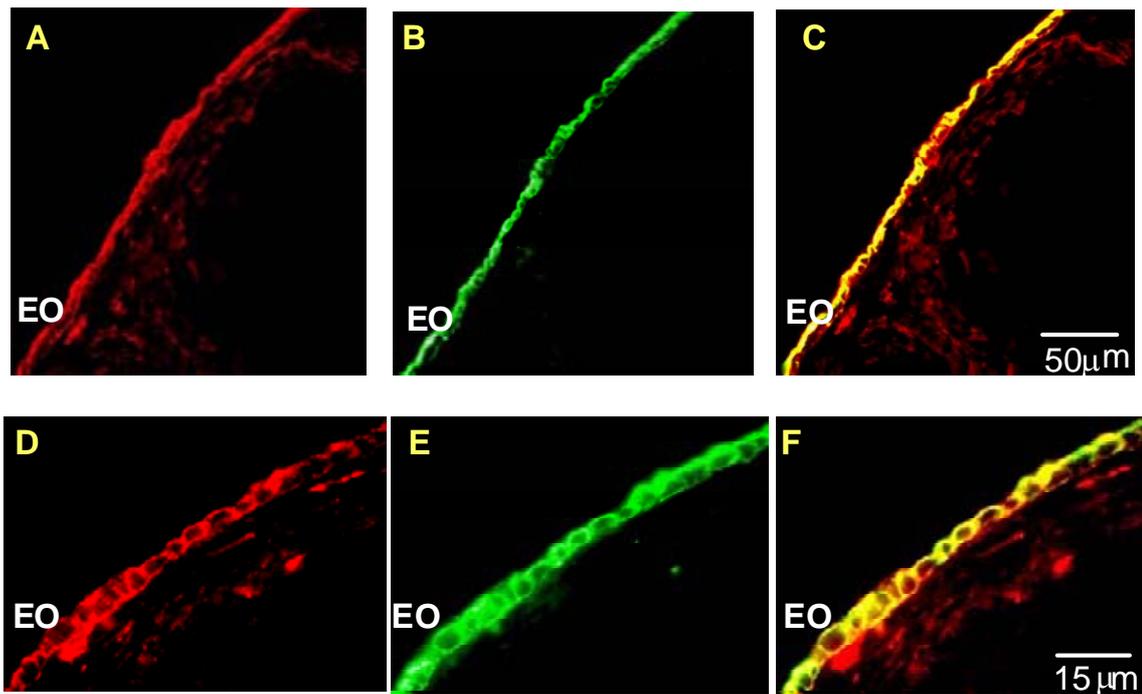


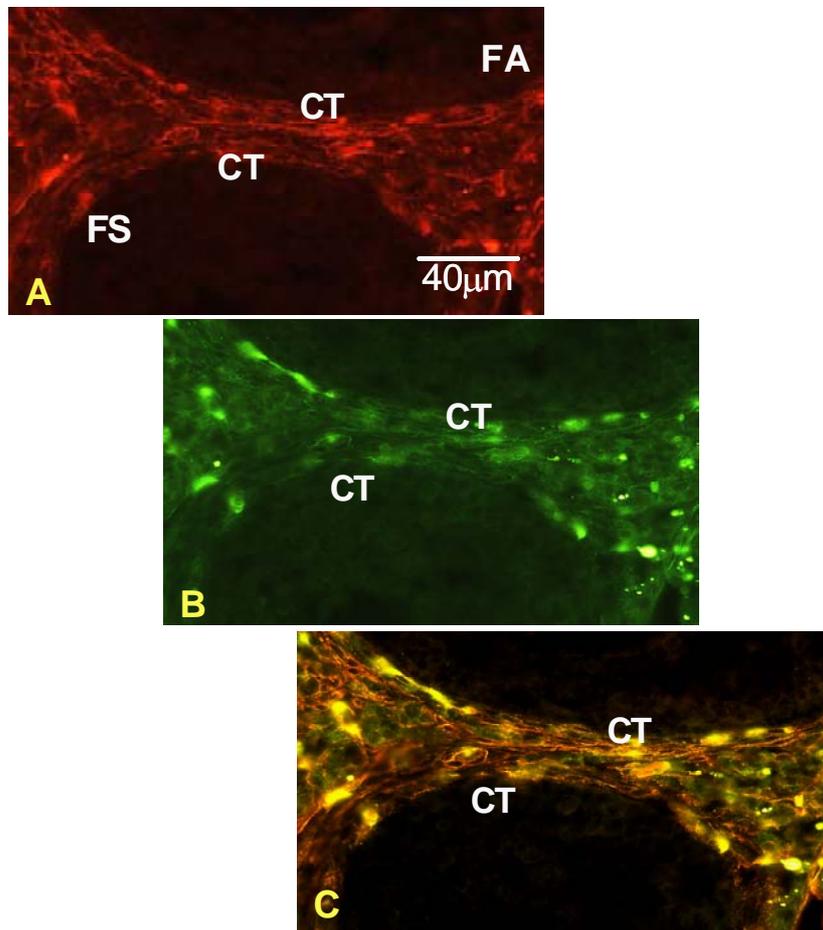
Fig 22. Inmunohistoquímica con doble marcaje en cortes de ovario de ratón. A y D) Marcaje con el anticuerpo P2X<sub>7</sub> (marcaje rojo). B y E) Marcaje con el anticuerpo TROMA-1 (EO) (marcaje verde). C ) A y B empalmadas, F) D y E empalmadas (marcaje amarillo).

## VI.6 CO-LOCALIZACIÓN DE RECEPTORES PURINÉRGICOS P2X<sub>7</sub> y P450<sub>scc</sub> EN CT

El receptor P2X<sub>7</sub> además de expresarse en el EO, también se expresa en las CT. Para corroborar la localización de la marca de estos receptores sobre las TC se realizaron co-localizaciones de este receptor y de la proteína P450<sub>scc</sub> que como ya se mencionó anteriormente se expresa de manera muy abundante en el citoplasma de las CT. Para este ensayo, se utilizaron anticuerpos anti-P2X<sub>7</sub> que fueron identificados con anticuerpos secundarios marcados con rodamina (marca roja) y anticuerpos anti-P450<sub>scc</sub> que fueron detectados con anticuerpos secundarios marcados con FITC (marca verde).

En la figura 23A se muestra la distribución del receptor P2X<sub>7</sub> sobre un folículo antral. La figura 23B muestra al mismo FA marcado con un anticuerpo anti-P450<sub>scc</sub>. Cuando ambas imágenes son empalmadas, se observan regiones de color amarillo (figura 23C), lo que indica que existe una co-localización entre el anticuerpo contra el receptor P2X<sub>7</sub> y el marcador de teca P450<sub>scc</sub>. Sin embargo, la marca amarilla no es

uniforme debido a que la marca que distingue al receptor P2X<sub>7</sub> se localiza en la membrana de las CT, mientras que la marca para la P450-scc se ubica principalmente en el citoplasma. Es por ello que, inclusive se logran observar varias CT y algunas células del estroma con fluorescencia verde dentro del folículo.



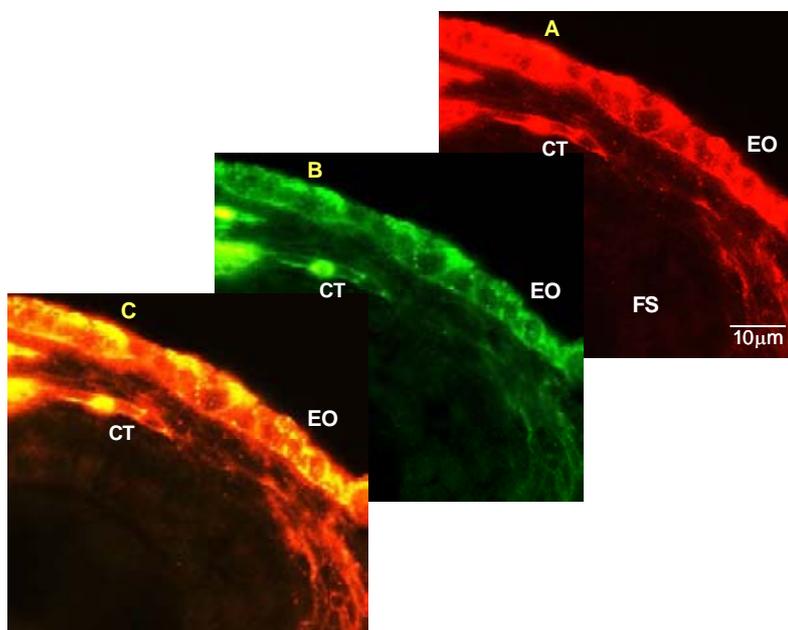
---

Fig 23. Inmunohistoquímica con doble marcaje en cortes de ovario de ratón. A) Marcaje con un anticuerpo anti-P2X<sub>7</sub> (marcaje rojo). B) Marcaje con el anticuerpo anti-P450scc (CT) (marcaje verde). C) A y B empalmadas, (marcaje amarillo).

---

En la figura 24 se muestra una región del ovario donde se observa el EO y las CT marcados con el anticuerpo contra el receptor P2X<sub>7</sub> (figura 24A) y con el anti-P450scc (figura 24B). En la figura 24C se muestra el empalme de las imágenes anteriores. Se puede observar que las CT del FS empiezan a mostrar marca para los dos anticuerpos, aunque la marca más abundante es del receptor purinérgico tanto en las CT como en el EO. Con estas observaciones podemos decir que a partir de

folículos secundarios cuando comienzan a formarse las primeras capas de las CT, estas ya expresan tanto al receptor P2X<sub>7</sub> como a la enzima citocromo P450<sub>scc</sub>.



**Fig 24.** Inmunohistoquímica con doble marcaje de FS y EO en cortes de ovario de ratón (40X). A) Marcaje con el anticuerpo P2X<sub>7</sub> y un anticuerpo secundario acoplado a rodamina (marcaje rojo). B) Marcaje con el anticuerpo anti-cP450<sub>scc</sub> y un anticuerpo secundario acoplado a FITC (marcaje verde). C) Montaje de las imágenes A y B.

## VI.7 IDENTIFICACIÓN DE RECEPTORES PURINÉRGICOS P2X<sub>2-3-5-6</sub> EN OVARIO.

Las inmunohistoquímicas realizadas con los anticuerpos dirigidos contra los receptores P2X<sub>2-3-5-6</sub> en cortes de ovario no mostraron ningún marcaje lo que sugiere que estos receptores no son expresados en este tejido.

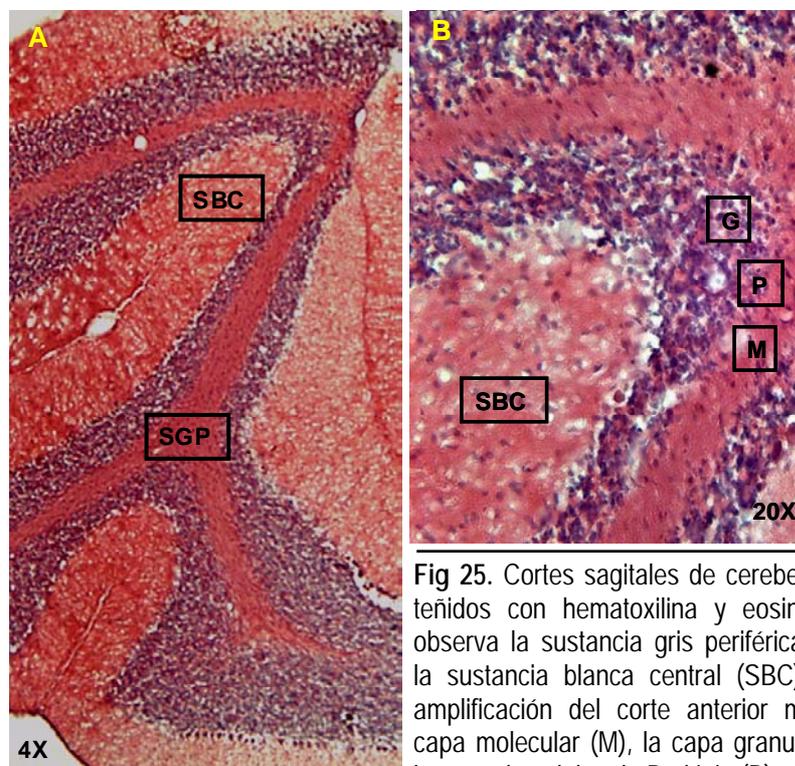
Sin embargo, en el laboratorio, empleando la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se han obtenido evidencias de que estos cuatro subtipos de receptores son expresados en cultivos primarios de CG. Para descartar que los resultados obtenidos por inmunohistoquímica son debidos a algún problema inherente a los anticuerpos empleados, entonces el siguiente paso fue emplear muestras donde ya ha sido reportado por ensayos de inmunohistoquímica, la expresión de receptores de estos tipos.

## VI.8 IDENTIFICACION DE RECEPTORES PURINÉRGICOS EN CORTES DE CEREBELO

Con el fin de corroborar la eficiencia y pertinencia de los anticuerpos anti-P2X<sub>2-3-5-6</sub> se realizaron inmunohistoquímicas sobre cortes de cerebelo de rata, donde se sabe que estos receptores se expresan de manera abundante.

Primero, para poder identificar las estructuras principales que constituyen a este tejido, se obtuvieron cortes sagitales de cerebelo y se tiñeron con hematoxilina y eosina. La figura 25A muestra la fotografía de una imagen en la que se observan los lóbulos que constituyen al cerebelo y donde se puede apreciar la presencia de la sustancia blanca central (SBC) y la sustancia gris periférica (SGP).

La figura 25B es una región de la imagen anterior donde se distinguen las tres capas que constituyen a la corteza: 1) La capa externa o molecular (M), gruesa, con pocos cuerpos neuronales pequeños y dispersos; 2) una capa simple de células de Purkinje grandes y separadas (P), y 3) una capa granular interna (G) de células pequeñas agrupadas muy estrechamente.



**Fig 25.** Cortes sagitales de cerebelo de rata teñidos con hematoxilina y eosina. A) Se observa la sustancia gris periférica (SGP) y la sustancia blanca central (SBC). B) Una ampliación del corte anterior muestra la capa molecular (M), la capa granulosa (G) y la capa de células de Purkinje (P).

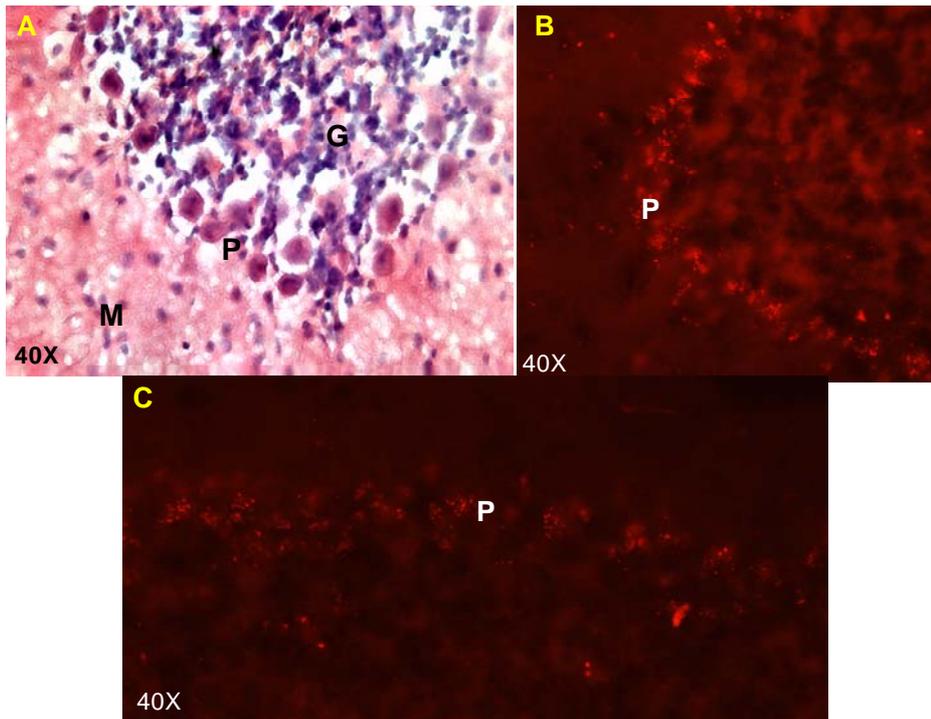
Una vez identificadas dichas estructuras, se procedió a realizar el marcaje con los anticuerpos contra los receptores P2X<sub>2-3-5-6</sub>.

La figura 26A muestra el control de las inmunohistoquímicas, en donde se omitió el primer anticuerpo y solo se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a rodamina.

La imagen 26B representa los resultados obtenidos con el anticuerpo anti-P2X<sub>2</sub> e incubado con un anticuerpo secundario acoplado a rodamina. El patrón de marcaje es principalmente en las células de Purkinje y con menor intensidad en las células de la capa granular, como ya ha sido reportado previamente (Rubio & Soto, 2001; Hervás et al., 2003).

En la figura 26C se muestra el marcaje obtenido empleando el anticuerpo anti-P2X<sub>3</sub> y el anticuerpo secundario acoplado a rodamina. El marcaje como se esperaba (Deuchars et al., 2001; Rubio & Soto, 2001; Hervás et al., 2003), se observa únicamente en las células de Purkinje.

Con estos resultados se pudo comprobar que los anticuerpos que estaban dirigidos contra los receptores purinérgicos P2X<sub>2</sub> y P2X<sub>3</sub> pueden reconocer a estas proteínas de manera específica en el cerebelo y que por lo tanto son eficientes. Estos resultados indican que la ausencia de marcaje en el ovario se debe muy probablemente a que estos receptores son expresados en este tejido a muy baja concentración y que la limitante de la técnica empleada no permite ponerlos de manifiesto.



**Fig 26.** Cortes sagitales de cerebelo de 10 $\mu$ m. A) Histología de un corte de cerebelo en campo claro, teñido con hematoxilina y eosina. B) Se muestra un corte de cerebelo incubado con el anticuerpo anti-P2X<sub>2</sub> y en C) se muestra un corte de cerebelo incubado con el anticuerpo anti-P2X<sub>3</sub>.

Con respecto a los cortes de cerebelo incubados con los anticuerpos P2X<sub>5</sub> y P2X<sub>6</sub> no se observó ningún marcaje lo que demuestra que los anticuerpos dirigidos contra estos receptores no son funcionales y esto podría explicar porque la expresión de estos receptores no pudo ser identificada en el ovario.

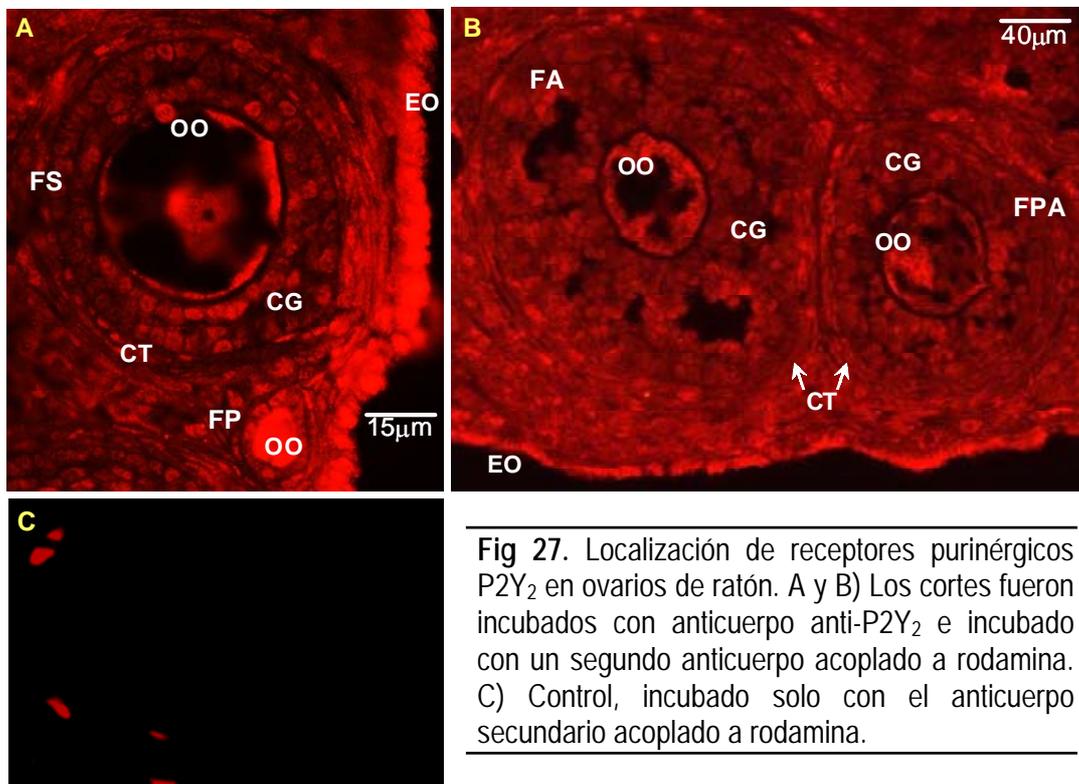
## VI.9 IDENTIFICACION DE RECEPTORES PURINÉRGICOS P2Y<sub>2</sub> EN OVARIO

Además de estudiar la expresión de los receptores purinérgicos P2X se realizaron inmunohistoquímicas con anticuerpos anti-P2Y<sub>2</sub> para la identificación de estos receptores en el ovario.

Las figuras 27A y B muestra dos diferentes cortes de ovario donde se observa el patrón de expresión de los receptores P2Y<sub>2</sub>. En estas imágenes se observa que la marca se distribuye en todo el ovario. Las células del estroma, las CG, las CT, el EO y el ovocito se marcan con este anticuerpo. Sin embargo, la

marca es más abundante en el EO, y en el ovocito de los FP. En estos últimos la marca se localiza tanto en el citoplasma como en la membrana. Un marcaje importante, también se observa en la membrana del ovocito de los folículos secundarios aunque también se aprecia algo de fluorescencia en el citoplasma alrededor del núcleo. La presencia de este receptor también se percibe en los folículos preantrales y antrales.

La imagen 27C representa el control para la inmunohistoquímica, en la cual fue omitido el primer anticuerpo (anti-P2Y<sub>2</sub>) y únicamente se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a rodamina. Con esta imagen podemos afirmar que el marcaje es específico para este subtipo de receptor purinérgico.



**Fig 27.** Localización de receptores purinérgicos P2Y<sub>2</sub> en ovarios de ratón. A y B) Los cortes fueron incubados con anticuerpo anti-P2Y<sub>2</sub> e incubado con un segundo anticuerpo acoplado a rodamina. C) Control, incubado solo con el anticuerpo secundario acoplado a rodamina.

Los resultados que se obtuvieron en este trabajo sobre la expresión de receptores purinérgicos en el ovario de ratón por inmunohistoquímica son resumidos en la siguiente tabla.

**Tabla 3.** Expresión de receptores purinérgicos en el ovario de ratón.

	FPr		FP		FS			FPA			FA				
	CG	OO					OO			OO			OO		
	+++	+++	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	+++	---
<b>P2X<sub>2</sub></b>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
<b>P2X<sub>3</sub></b>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
<b>P2X<sub>4</sub></b>	++	++	++	+++	---	++	+++	+	++	---	+	++	---	+++	+
<b>P2X<sub>5</sub></b>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
<b>P2X<sub>6</sub></b>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
<b>P2X<sub>7</sub></b>	---	---	+	---	+++	+	---	+++	+	---	+++	+	---	++++	+
<b>P2Y<sub>2</sub></b>	++++	++++	++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++++	++

EO=epitelio ovárico, CE=células del estroma, CT=células de la teca, CG=células de la granulosa, OO=ovocito, FPr=folículo primordial, FP=folículo primario, FS=folículo secundario, FPA=folículo preantral y FA=Folículo antral. Las líneas punteadas (---) indican que los receptores purinérgicos no fueron evidenciados con la técnica empleada en este trabajo.

## VII. DISCUSIÓN

Este trabajo tuvo el propósito de evidenciar, a través de un estudio por inmunohistoquímica, la expresión de los receptores purinérgicos en los folículos ováricos durante su desarrollo así como en los diferentes tipos celulares que los conforman.

La información que se obtuvo apoya y amplía la información previamente obtenida haciendo uso de la técnica de RT-PCR y electrofisiología en nuestro laboratorio (Vázquez-Cuevas et al., 2006), y la reportada por Webb et al. (2002), Tai et al. (2000, 2001a, 2001b y 2004), Schultze-Mosgau et al. (2000) y Parck et al. (2003), quienes sustentan que en cultivo las CG, así como las células del EO, expresan receptores purinérgicos. El estudio que presentamos aquí permitió además definir los sitios de expresión de estos receptores en el ovario. Aún y cuando un trabajo previo realizado también con métodos inmunohistoquímicos por el grupo de Burnstock (Bardini et al., 2000), no logró identificar la expresión de receptores del tipo P2X en el ovario, nuestros resultados, por el contrario muestran sin lugar a dudas la expresión de estos receptores no tan solo en las CG sino en otros tipos celulares que conforman el ovario. Es por ello que los resultados presentados en esta tesis son de una relevancia importante pues aportan la primera evidencia de la localización *in situ* de los receptores purinérgicos en el ovario, tanto del tipo P2X como del tipo P2Y. La localización específica de algunos tipos sugiere que estos receptores y su ligando, el ATP, podrían tener un papel importante en la fisiología del ovario.

### VII.1 ATP EN EL OVARIO

El papel del ATP como una molécula de señalización extracelular ha quedado establecido sin lugar a duda (Burnstock 1972, 1997, 1999, 2002; Kennedy & Burnstock 1985). Sin embargo el papel que pudiera jugar en la fisiología del ovario no ha sido explorado. Teniendo en cuenta que el ovario es un órgano donde se ha identificado la presencia de otros neurotransmisores, tales como la dopamina (DA), la noradrenalina (NE) (Les Dees et al., 1995) y la acetilcolina (ACh) (Mayerhofer, et al., 1998; Fritz et al., 1999, 2001), hace posible pensar que el ATP podría estar presente en este órgano como otra molécula de señalización extracelular y que podría ser importante para regular

la fisiología del ovario. Las fuentes de ATP extracelular podrían ser varias pero tomando en cuenta que la DA y NE pueden ser sintetizadas en el ovario, es posible sugerir que como estas moléculas, el ATP podría ser liberado por las mismas células que conforman este órgano, lo cuál sería un mecanismo semejante al reportado en el folículo de la rana *Xenopus laevis* por nuestro grupo y otros autores (Saldaña et al., 2005; Vázquez-Cuevas et al., 2006; Moroto & Hamill, 2001).

En células de la granulosa humana el efecto que tiene el ATP extracelular al unirse a sus receptores purinérgicos (P2) es activar a un grupo de cinasas activadoras de mitógeno, quienes están involucradas en convertir estímulos externos en internos. Algunas de estas enzimas están involucradas con su función a nivel nuclear en donde pueden activar cascadas de señalización, siendo relacionadas principalmente con la activación de genes tempranos involucrados en la diferenciación y crecimiento celular (Tai et al., 2004).

## **VII.2 RECEPTORES PURINÉRGICOS EN OVARIO**

### **VII.2.a Receptores P2X<sub>1</sub>**

Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que los vasos sanguíneos que están irrigando al ovario y en particular los que se encuentran cerca de los folículos antrales (FA) y folículos preantrales (FPA) en cercanía con las células de la teca (CT), expresan receptores P2X<sub>1</sub>.

En otro trabajo ya han sido evidenciados estos receptores en vasos sanguíneos del ovario y en otros tejidos del sistema reproductor en ratas (Bardini M. et al., 2000). Esto demuestra que el anticuerpo que se empleó es eficaz para reconocer la expresión de estas proteínas.

Existe evidencia desde los 70's (Pearson & Gordon, 1979) indicando que pequeños vasos sanguíneos que han sido sujetos a un trauma o que son expuestos a enzimas proteolíticas tienden a liberar ATP. También se conoce que la activación de los receptores purinérgicos (P2X y P2Y) en el endotelio vascular desencadena una gran diversidad de acciones fisiológicas, principalmente se ha observado un incremento en la concentración de calcio citosólico que puede desencadenar a su vez la secreción de óxido nítrico, ATP,

prostaciclina, endotelina y otras sustancias (Ramirez & Kunze, 2002). Además se ha observado que el ATP es liberado de las células endoteliales en estado de estrés y esta liberación se ha relacionado con proliferación y migración celular (Dubyak 2002, 2003).

El marcaje con el anticuerpo anti P2X<sub>1</sub> no se limitó a los vasos sanguíneos y también es notorio el inmunomarcado específico en los FPA. Aún y cuando no es por el momento fácil de determinar con exactitud la localización debido a la morfología del FPA, el marcaje parece indicar que tanto las células pregranulosas (por su morfología plana y su adosamiento al ovocito) como la membrana del ovocito expresan receptores P2X<sub>1</sub>. El hecho de que el marcado de P2X<sub>1</sub> se encuentre de forma específica en folículos de este tipo abre la posibilidad de que la señalización purinérgica tenga un papel importante durante esta etapa de definición del desarrollo folicular o en el de la diferenciación de las propias células de la granulosa. Sin duda, una mayor cantidad de estudios deberán de realizarse para conocer más acerca de los posibles papeles de P2X<sub>1</sub> en los comienzos de la foliculogénesis.

### **VII.2.b Receptores P2X<sub>4</sub>**

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran la expresión de los receptores P2X<sub>4</sub> en varios tipos celulares del ovario. Las CG de todos los folículos, es decir, desde los folículos preantrales hasta los folículos antrales expresan este receptor en sus membranas, mientras que los ovocitos de los folículos preantrales, folículos primarios y folículos secundarios mostraban expresión de este receptor. Además, se pudo distinguir que las células del EO, también expresan el receptor P2X<sub>4</sub>, así como las células del estroma, aunque estas últimas mostraron una mucho menor inmunoreactividad.

Es importante mencionar que el receptor P2X<sub>4</sub> es el que tiene una mayor distribución en los diferentes tejidos de mamíferos hasta ahora analizados. Este tipo de receptor ha sido localizado por mencionar solo algunos ejemplos en el cerebelo, cerebro, intestino, páncreas, hígado, testículos, vagina, útero, ovario (células foliculares de folículos preantrales) (Bo et al., 2003).

El papel principal de los receptores P2X en la fisiología celular es la transmisión de señales rápidas. También, se ha demostrado que la expresión

de receptores P2X<sub>4</sub> en las células HEK 293 provoca un aumento de calcio intracelular. Este aumento podría inducir la activación de otros canales que son dependientes de calcio o que son dependientes de voltaje, con consecuencias tan importantes como la regulación de la expresión génica (Bo et al., 2003).

La observación de que casi todos los tipos celulares que conforman al ovario expresan estos receptores sugiere que éstos podrían estar participando en algún proceso general y esencial para la sobrevivencia celular.

### **VII.2.c Receptores P2X<sub>7</sub>**

Los receptores P2X<sub>7</sub> fueron localizados en las CT de folículos preantrales y antrales, células del EO y con baja inmunoreactividad en las CG de todos los folículos.

Estos resultados confirmaron en parte los ya obtenidos en nuestro laboratorio a través de estudios de RT-PCR a partir de RNA de células de la granulosa y de la teca mantenidas en cultivo. Pero además, el estudio por inmunohistoquímica permitió identificar la expresión de estos receptores en las células del EO y mostrar que la expresión de este receptor es muy fuerte en las CT, en claro contraste con las demás células del ovario.

Debido a la alta especificidad del marcaje observado en las CT, en el laboratorio decidimos realizar una serie de estudios que nos permitieran ayudar a definir el papel que estos receptores podrían jugar en este tipo celular. Los resultados obtenidos hasta el momento muestran que la activación de los receptores P2X<sub>7</sub> inducen un aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular y promueven la apoptosis de las CT (Vázquez-Cuevas et al., 2006). La inducción de apoptosis a través de receptores P2X<sub>7</sub> también ha sido documentada para las células del epitelio cervical (Gorodeski, 2002), células dendríticas (Nihei et al., 2000, Ferrari et al., 2000), neuronas corticales, monocitos y macrófagos (Humphreys et al., 2000, Hanley et al., 2004) solo por mencionar algunos ejemplos.

Aunque la apoptosis es un mecanismo clave en el ovario donde el receptor P2X<sub>7</sub> podría estar participando, otros eventos importantes que estimulan la inflamación son desarrollados durante la ovulación y en estos el receptor P2X<sub>7</sub> también podría tener algún papel. Diversas evidencias muestran que la activación de receptores P2X<sub>7</sub> en macrófagos, estimula la producción de

la IL-6, plasminógeno y óxido nítrico, moléculas clave en el proceso de inflamación (Inoue et al., 1998; Hide et al., 2000; Inoue, 2002, Hanley, 2004). Como los macrófagos, las células del epitelio ovárico también producen estas moléculas durante el proceso de ovulación, por lo que es factible pensar que su producción podría también ser regulado a través de receptores P2X<sub>7</sub> presentes en su membrana y de esta manera participar en fenómenos de este tipo.

#### **VII.2.d Receptores P2Y<sub>2</sub>**

En los resultados que se presentaron se aprecia inmunoreactividad para los receptores P2Y<sub>2</sub> en casi todas las células que conforman al ovario (CG, CT, ovocitos, EO y algunas células del estroma). La expresión de este receptor no presentó diferencias en las diferentes etapas de desarrollo de los folículos.

La marca más abundante la presentaron las células del EO y el ovocito de los folículos primarios y secundarios, al parecer el ovocito expresa receptores P2Y<sub>2</sub> tanto en su membrana como en el citoplasma. El que este receptor se exprese en todas las células que conforman al ovario, sugiere que puede tener un papel esencial para el funcionamiento celular.

Los receptores P2Y<sub>2</sub> son proteínas que se encuentran acopladas a proteínas G que activan a la PLC y a la PLD, aunque también podrían activar a la PLA<sub>2</sub> y activar la cascada de ácido araquidónico con la producción de sus metabolitos, como lo son la síntesis de prostaglandinas, leucotrienos tromboxanos, entre otros. Los receptores P2Y<sub>2</sub> están presentes en varios tipos celulares que presentan un incremento en los niveles de IP<sub>3</sub> y de Ca<sup>2+</sup> intracelular al ser expuestas a ATP (para ver revisión: Ralevic & Burnstock 1998; Communi et al., 2000).

De manera particular, evidencias previas obtenidas en nuestro laboratorio y en otros han demostrado que los receptores de este tipo son expresados en las CG y que además son funcionales tanto en humano, porcino y roedores (Kamada et al., 1994; Lee et al., 1996; Tai CH-J et al., 2000, 2001<sup>a</sup>, 2001<sup>b</sup>; Webb et al., 2002., Arellano et al., 2002, Garay et al., 2002). También existen evidencias que muestran que los receptores P2Y<sub>2</sub> son expresados en células inmortalizadas del EO y que su activación promueve la división celular. Por esta razón se ha sugerido que si existe alguna alteración en la expresión

de los receptores P2Y<sub>2</sub> en las células del EO, esto podría contribuir a desencadenar una proliferación celular sin control, que conduciría al desarrollo de cáncer de ovario (Choi et al., 2003).

Los efectos mitogénicos del ATP a través de los receptores P2Y<sub>2</sub> han sido observados también en otros tipos celulares como células de glioma C6 (Tu et al., 2000), células glomerulares, células del músculo liso (Erlinge, 1998) entre otros.

### **VII.3 Interacción de purinas y pirimidinas con factores de crecimiento**

Un gran número de experimentos, principalmente en cultivos de astrocitos demuestran que los efectos de las purinas y las pirimidinas pueden al menos en parte ser regulados por interacciones con algunos factores de crecimiento (Zafra et al., 1992). El sinergismo entre el ATP y los factores de crecimiento polipeptídicos aumentan la mitogénesis en astrocitos primarios y células de neuroblastoma. Por ejemplo, la incorporación de timidina tritiada aumenta 52 veces en el núcleo de los astrocitos cuando son expuestos a ATP y FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), mientras que la incorporación de timidina tritiada es de 2 veces cuando solo se aplica ATP y 14 veces cuando solo se adiciona el FGF. Esta interacción parece ser altamente específica ya que con otros factores de crecimiento no se observaban estos incrementos en la síntesis del DNA.

En el ovario se produce también el FGF y muchos otros factores de crecimiento como los factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGF) I y II, el factor de crecimiento Transformante (TGF), el factor de crecimiento epidermal (EGF), etc. La existencia de receptores purinérgicos en las diferentes células que conforman al ovario, y la presencia de todos estos factores de crecimiento que regulan la foliculogénesis podrían estar actuando en sinergia para controlar la proliferación, el crecimiento y la apoptosis en el ovario.

## **VIII. CONCLUSIÓN**

En resumen, en este estudio hemos mostrado que los receptores purinérgicos de los subtipos P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>7</sub> y P2Y<sub>2</sub> son expresados de manera diferencial en las células que conforman al ovario. Esto podría sugerir que estos receptores actúan de manera activa y diferencial en el crecimiento folicular, en la ovulación, además de su probable participación en la atresia folicular, eventos importantes para la reproducción de la especie.

## PARTICIPACIÓN EN EL CONGRESO NACIONAL DE FISIOLOGÍA

**Juárez B**, Garay E & Arellano RO (2003) Expresión de receptores purinérgicos durante la foliculogénesis en el ovario. XLVI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas.

## ARTÍCULO

Vázquez-Cuevas FG, **Juárez B**, Garay E. & Arellano RO (2006) ATP-Induced apoptotic cell death in porcine ovarian theca cell through P2X<sub>7</sub> receptor activation. *Molecular Reproduction and Development*. 73: 745-755.

## IX. REFERENCIAS

- Abbracchio MP (1997) P1 and P2 receptors in cell growth and differentiation. *Drug Dev Res.* 39:393-406.
- Abbracchio MP & Burnstock G (1998) Purinergic signaling: Pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol.* 78: 113-145.
- Alak BM, Coskun S, Friedman CI, Kennard EA, Kim MH & Seifer DB (1998) Activin A stimulates meiotic maturation of human oocytes and modulates granulosa cell steroidogenesis in vitro. *Fertil and Steril.* 70: 1126-1130.
- Aleu J, Martín-Sturé M, Navarro P, Perez I, Bahima Laia, Marsal J & Solsona C. (2003) Release of ATP induced by hypertonic solutions in *Xenopus* oocytes. *J Physiol.* 547(1): 209-219.
- Arellano RO, Martínez-Torres A & Garay E (2002) Ionic currents activated via purinergic receptors in the cumulus cell-enclosed mouse oocyte. *Biol Reprod.* 67: 837-846.
- Auersperg N, Wong AST, Choi K-CH, Kang SK & Leung PCK. (2001) Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocrino Rev.* 22(2): 255-288.
- Bo X, Kim M, Nori SL, Schoepfer R, Burnstock G & North RA. (2003) Tissue distribution of P2X4 receptors studied with an ectodomain antibody. *Cell Tissue Res.* 313: 159-165.
- Bardini M, Yeon H & Burnstock G (2000) Distribution of P2X receptor of P2X receptor subtypes in the rat female reproductive tract at late pro-oestrus/early oestrus. *Cell Tissue Res.* 299:105-113.
- Bodin P & Burnstock G (2001) Purinergic Signalling: ATP Release. *Neurochem Res.* 26(8/9): 959-969.
- Burnstock G (1972) Purinergic nerves. *Pharmacol Review.* 24: 509-581.
- Burnstock G (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptors. In *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*, ed. RW Straub, L. Boils. pp 107-118.
- Burnstock G (1996) A unifying purinergic hypothesis for the initiation of pain. *Lancet.* 347: 1604-1605.
- Burnstock G (1997) The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacol.* 36: 1127-1139.
- Burnstock G (1999) Purinergic cotransmission. *Brain Res Bull.* 50(85-6): 355-357.
- Burnstock G (2002) Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22:364-373.
- <sup>a</sup>Choi K-CH, Auersperg N & Leung PCK (2003) Mitogen-activated protein kinases in normal and preneoplastic ovarian surface epithelium. *Reprod Biol Endocrino.* 70:1-8.
- <sup>b</sup>Choi K-CH, Tai CH-J, Tzeng CH-R, Auersperg N & Leung PCK (2003) Adenosine triphosphate activates mitogen-activated protein kinase in pre-neoplastic and neoplastic ovarian surface epithelial cells. *Biol Reprod.* 68: 309-315.
- Chow SC, Kass GE & Orrenius S (1997) Purines and their roles in apoptosis. *Neuropharmacol Review.* 36(9): 1149-1156.

- Communi D, Rodolphe J, Suarez-Huerta N, Robaye B & Boeynaems JM (2000) Advances in signaling by extracellular nucleotides: the role and transduction mechanisms of P2Y receptors. *Cell Signal*. 12: 351-360.
- Cotrina ML, Lin JH, Alves-Rodrigues A, Liu S, Li J, Azmi-Ghadimi H, Kang J, Naus CC & Nedergaard M (1998) Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95: 15735-15740.
- Deuchars SA, Atkinson L, Brooke RE, Musa H, Milligan CJ, Batten T, Buckley N, Parson S & Deuchars J. (2001) Neuronal P2X<sub>7</sub> receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems. *J Neurosci*. 21(18): 7143-7152.
- Di Virgilio F, Chiozz P, Falzoni S, Ferrari D, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G & Baricordi OR (2001) Nucleotide receptor: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood*. 97(3): 587-600.
- Dorsam RT, Kunapuli SP. (2004) Central role of the P2Y<sub>12</sub> receptor in platelet activation. *J Clin Invest*. 113(3):340-345.
- Downs SM (1997) Involvement of purine nucleotide synthetic pathways in gonadotropin-induced meiotic maturation in mouse cumulus cell-enclosed oocytes. *Mol Reprod Dev*. 46: 155-167.
- Driancourt M & Thuel B (1998). Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. *Reprod Nutr Dev Review*. 38: 345-362.
- Drury AN & Szent-Györgyi A (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action up on the mammalian heart. *J Physiol*. 68: 213-237.
- Dubyak GR (2002) Focus on "extracellular ATP signaling and P2X nucleotide receptors in monolayers of primary human vascular endothelial cells". *Am J Physiol Cell Physiol*. 51: C242-C244.
- Dubyak G.R. (2003) Knock-out mice reveal tissue-specific roles of P2Y receptor subtypes in different epithelia. *Mol Pharmacol*. 63: 773-776.
- Dusseau JW & Hutchins PM (1988) Hypoxia-induced angiogenesis in chick choriocapillary membranes: a role for adenosine. *Respir Physiol*. 71: 33-44.
- Elvin J & Matzuk M (1998) Mouse models of ovarian failure. *Rev Reprod*. 3: 183-195.
- Epifano O & Dean J. (2002) Genetic control of early folliculogenesis in mice. *Trends Endocrinol Metab*. 13(4): 169-173.
- Eppig JJ, Ward-Bailey PF & Coleman DL (1985) Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. *Biol Reprod*. 33: 1041-1049.
- Eppig JJ, Wigglesworth K. & Pendola F (2002) The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99(5): 2890-2894.
- Erickson GF & Shimasaki S (2001) The physiology of folliculogenesis: the roll of novel growth factors. *Fertil and Steril*. 76(5): 943-949.
- Erlinge D. (1998) Extracellular ATP: a growth factor for vascular smooth muscle cells. *Gen Pharmacol*. 31(1): 1-8.
- Fair T (2003) Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci*. 78: 203-216.
- Ferrari D, La Sala A, Chiozzi P, Morelli A, Falzoni S, Girolomoni G, Idzko M, Dichmann S, Norgauer J & Di Virgilio F (2000) The P2 purinergic receptors

- of human dendritic cell: identification and coupling to cytokine release. *FASEB J.* 14: 2466-2476.
- Fritz S, Föhr KJ, Boddien S, Berg U, Brucker C & Mayerhofer A (1999) Functional and molecular characterization of a muscarinic receptor type and evidence for expression of choline-acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter in human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Soc.* 84(5): 1744-1750.
  - Fritz S, Wessler I, Breitling R, Rossmannith W, Ojeda SR, Dissen GA, Amsterdam A, Amsterdam A & Mayerhofer A (2001) Expression of muscarinic receptor types in the primate ovary and evidence for nonneuronal acetylcholine synthesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 86(1): 349-354.
  - Garay E, Velázquez NP, Juárez AB, Sánchez UR & Arellano RO (2002) mRNA expression and localization of P2Y receptor subtypes in granulosa cells from mouse and human. *Biol Reprod.* 66(S1): 209.
  - Glass R, Townsend-Nicholson A & Burnstock G. (2000) P2 receptors in the thymus: expression of P2X and P2Y receptors in adult rats, an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Cell Tissue Res.* 300: 295-306.
  - Gonzales FA, Bonapace E, Belzer I, Friedberg I & Heppel LA (1989) Two distinct receptors for ATP can be distinguished in swiss 3T6 mouse fibroblasts by their desensitization. *Biochem Biophys Res Commun.* 164: 706-713.
  - Gorodeski G (2002) Expression, regulation, and function of P2X<sub>4</sub> purinergic receptor in human cervical epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 282: C84-C93.
  - Hanley PJ, Musset B, Reigunta V, Limberg S, Dalpke A, Sus R, Heeg K, Presisig-Müller R & Daut J (2004) Extracellular ATP induce oscillations of intracellular Ca<sup>2+</sup> and membrane potential and promotes transcription of IL-6 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101(25): 9479-9484.
  - Hazama A, Hayashi S & Okada Y. (1998) Cell surface measurements of ATP release from single pancreatic  $\beta$  cells using a novel biosensor technique. *Pflugers Arch.* 437: 31-35.
  - Hervas C, Pérez-Sen R & Miras-Portugal MT. (2003) Coexpression of functional P2X and P2Y nucleotide receptors in single cerebellar granule cells. *Journal of Neurosci Res.* 73: 384-399.
  - Hide I, Tanaka M, Inoue A, Inoue K, Nakajima K, Kohsaka S & Nakata Y (2000) Extracellular ATP triggers TNF $\alpha$  release from rat microglia. *J Neurochem.* 75:965-972.
  - Holton P (1959) The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol.* 145: 494-504.
  - Humphreys B, Rice J, Kertesz SB & Dubyak GR (2000) Stress-activated protein kinase/JNK activation and apoptotic induction by the macrophage P2X<sub>7</sub> nucleotide receptor. *J Biol Chem.* 275(35): 26792-26798.
  - Inoue K. (2002) Microglia activation by purines and pyrimidines. *Glia (Review).* 40:156-163.
  - Inoue K, Nakajima K, Morimoto T, Kikuchi Y, Koizumi S, Iles P & Kohsaka S (1998) ATP stimulates Ca<sup>2+</sup> dependent plasminogen release from cultured microglia. *Br J Pharmacol.* 123: 1304-1310.

- Kamada S, Blackmore PF, Oehninger S, Gordon K & Hodgen GD (1994) Existence of P2-purinoceptors on human and porcine granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 78(3): 650-656.
- Katsuragi T, Tokunaga T, Ogawa S, Soejima O, Sato C & Furukawa T (1991) Existence of ATP-evoked ATP release system in smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 259:513-518.
- Kennedy C & Burnstock G (1985) Evidence for two types of P2-purinoceptor I longitudinal muscle of the rabbit portal vein. *Eur J Pharmacol.* 111(1): 49-56.
- King BF, Neary JT, Zhu Q, Wang S, Norenberg MD & Burnstock G (1996) P2 purinoceptors in rat cortical astrocytes: expression, calcium-imaging studies. *Neuroscience.* 74(4): 1187-1196.
- Knight GE, Bodin P, Groat WC & Burnstock G (2002) ATP is released from guinea pig ureter epithelium on distension. *Am J Physiol Renal Physiol.* 282: F281-F288.
- Knight PG & Glister C (2001) Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reprod Review.* 121: 503-512.
- Lalevée N, Rogier Ch, Becq F & Joffre M (1999) Acute effects of adenosine triphosphates, cyclic 3',5'-adenosine monophosphates, and follicle-stimulating hormone on cytosolic calcium level in cultured immature rat sertoli cells. *Biol Reprod.* 61: 343-352.
- Lazarowski ER, Boucher RC & Harden TK (2003) Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X and P2Y receptor activating molecules. *Mol Pharmacol.* 64(4): 785-795.
- Lee PSN, Squires PE, Buchan AMJ, Yuen BH & Leung PCK (1996) P2-purinoreceptor evoked changes in intracellular calcium oscillations in single isolated human granulosa-lutein cells. *J Endocrinol.* 137(9): 3756-3761.
- Leon C, Ravanat C, Freund M, Cazenave JP, Gachet C (2003) Differential involvement of the P2Y1 and P2Y12 receptors in platelet procoagulant activity. *Arterioscler Thromb Vas Biol.* 23(10):1941-1947.
- Les Dees W, Hiney JK, Schulte TD, Mayerhofer A, Danilchik M, Dissen GA & Ojeda SR (1995) The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuron-like cells expressing nerve growth factor receptor. *J Endocrinol.* 136(12): 5760-5768.
- Lin-Hua J, Rassendren F, Surprenant A & North A (2000) Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *J Biol Chem.* 275(44): 34190-34196.
- Lundberg JM, Franco-Cereceda A, Hemsén A, Lacroix JS & Pernow J (1990) Pharmacology of noradrenaline and neuropeptide tyrosine (NPY) mediated sympathetic cotransmission. *Fundam Clin Pharmacol* 4:373-391.
- Mayerhofer A., Smith GD, Danilchik m, Levine JE, Wolf DP, Dissen GA & Ojeda SR (1998) Oocytes are a source of catecholamines in the primate ovary: Evidence for a cell-cell regulatory loop. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 10990-10995.
- Moroto R & Hamill OP (2001) A brefeldin block of integrin-dependent mechanosensitive ATP release from *Xenopus* oocytes reveals a novel mechanism of mechanotransduction. *J Biol Chem.* 276: 23867-23872.
- Murdoch WJ & Gottsch ML (2003). Protolytic mechanisms in the ovulatory folliculo-luteal transformation. *Connect Tissue Res.* 44:50-57.

- Murdoch WJ & McDonnell AC (2002) Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis. *Reproduction*. 123: 743-750.
- Murdoch WJ, Townsend RS & McDonnell AC (2001) Ovulation-Induced DNA damage in ovarian surface epithelial cells of ewes: prospective regulatory mechanisms of repair/survival and apoptosis. *Biol Reprod*. 65(5):1417-1424.
- Neary JT, Baker L, Jorgensen SL & Norenberg MD (1994) Extracellular ATP induces stellation and increases glial fibrillary acidic protein content and DNA synthesis in primary astrocytic cultures. *Acta Neuropathol*. 87: 8-13.
- Neary JT, Rathbone MP, Cattabeni F, Abbracchio MP & Burnstock G (1996) Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. *Trends Neurosci*. 19:13-18.
- Nihei OK, Campos AC, Savino W. & Alves LA (2000) Pharmacologic properties of P<sub>2Z</sub>/P<sub>2X7</sub> receptor characterized in murine dendritic cells: role on the induction of apoptosis. *Blood*. 96(3): 996-1005.
- Nörenberg W & Illes P (2000) Neuronal P<sub>2X</sub> receptors: localization and functional properties. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 362: 324-339.
- North A & Surprenant A (2000) Pharmacology of cloned P<sub>2X</sub> receptor. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 40: 563-580.
- Park DW, Cho T, Kim MR, Kim YA, Min CHK & Hwang KJ (2003) ATP-induced apoptosis of human granulosa luteal cells cultures in vivo. *Fertil Steril*. 80(4): 993-1002.
- Pearson JD & Gordon JL (1979) Vascular endothelial and smooth muscle cells in culture selectively release adenine nucleotides. *Nature*. 281: 384-386.
- Pospisil M, Hofer M, Netikova J, Pipalova I, Vacek A, Bartonickova A & Volenec K (1993) Elevation of extracellular adenosine induces radioprotective effect in mice. *Radiat Res*. 134: 323-330.
- Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Katz L, LaMantia AS, McNamara J & Williams M (2001) Intracellular signal transduction. *Neuroscience*. 2a. Ed. Printed in USA. Cap 8, 173 y 180.
- Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Katz L, LaMantia AS, McNamara J & Williams M (2001) Neurotransmitter receptors and their effects. *Neuroscience*. 2a. Ed. Printed in USA. Cap 7, 159.
- Queiroz G, Meyer DK, Starke K & von Kügelen, I (1999) A study of the mechanism of the release of ATP from rat cortical astroglial cells evoked by activation of glutamate receptors. *Neuroscience*. 91: 1171-1181.
- Ralevic V & Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*. 50(3): 415-419.
- Ramirez A & Kunze DL (2002) P<sub>2X</sub> purinergic receptor channel expression and function in bovine aortic endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 282: H2106–H2116.
- Rapaport E (1983) Treatment of human tumor cells with ADP or ATP yield arrest of growth in the S phase of the cell cycle. *J Cell Physiol*. 114: 279-283.

- Rassendren F, Buell G, Newbolt A, North RA & Surprenant A (1997) Identification of amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor. *EMBO J.* 16(12):3446-3454.
- Ribeiro, JA (1995) Purinergic inhibition of neurotransmitter release in the central nervous system. *Pharmacol. Toxicol.* 77: 299-305.
- Romanello M, Pani B, Bicego M & D'Andrea P (2001) Mechanically induced ATP release from human osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 289, 1275-1281.
- Rozengurt E (1982) Adenosine receptor activation in quiescent Swiss 3T3 cells: Enhancement of cAMP levels, DNA synthesis and cell division. *Exp Cell Res.* 139: 71-78.
- Rubio M & Soto F (2001) Distinct localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *J Neurosci.* 21(2): 641-653.
- Saldana C, Vazquez-Cuevas F, Garay E, Arellano RO (2005) Epithelium and/or theca are required for ATP-elicited K<sup>+</sup> current in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *J Cell Physiol.* 202(3): 814-21.
- Sak K, Boeynaems J-M & Everaus H (2003) Involvement of P2Y receptors in the differentiation of hematopoietic cell. *J Leukoc Biol.* 73: 442-447.
- Sandberg G & Fredholm BB (1981) Regulation of thymocyte proliferation: effects of L-alanine, adenosine and cyclic AMP in vitro. *Thymus.* 3: 63-75.
- Sawada M, Kondo N, Suzumura A & Marunouchi T (1989) Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res.* 491: 394-397.
- Schultze-Mosgau A, Katzur AC, Arora KK, Stojilkovic SS, Dledrich K & Ortmann O (2000) Characterization of calcium-mobilizing, purinergic P2Y<sub>2</sub> receptors in human ovarian cancer cell. *Mol Hum Reprod.* 6(5): 435-442.
- Silinsky EM & Hubbard JI (1973) Release of ATP from motor nerve terminals. *Nature.* 243:404-405.
- Sluyter R, Barden J & Wiley J (2001) Detection of P2X purinergic receptors on human B lymphocytes. *Cell Tissue Res.* 304:231-236.
- Sneddon P, Westfall DP & Fedan JS (1982) Cotransmitters in the motor nerves of the guinea-pig vas deferens: Electrophysiological evidence. *Science.* 218:693-695
- Sperl agh B & Vizi S (1996) Neuronal synthesis, storage and release of ATP. *Neurosciences.* 8: 175-186.
- Sprague RS, Ellsworth ML, Stephenson AH, Kleinhenz ME & Lonigro AJ (1998) Deformation-induced ATP release from red blood cells requires CFTR activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 275: H1726-H1732.
- Stjarne L (1989) Basic mechanisms and local modulation of nerve impulse-induced secretion of neurotransmitters from individual sympathetic nerve varicosities. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 112: 4-122.
- Tai CH-J, Kang SK, Cheng KW, Choi K-CH, Nathwani S & Leung PCK (2000) Expression and regulation of P2U-purinergic receptor in human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 85(4): 1591-1597.
- <sup>a</sup>Tai CH-J, Kang SK, Tzeng CH-R & Leung PCK (2001) Adenosine triphosphate activates mitogen-activated protein kinase in human granulosa-luteal cells. *Endocrinol.* 142(4): 1554-1560.

- <sup>b</sup>Tai CH-J, Kang SK & Leung PCK (2001) Adenosine triphosphate-evoked cytosolic calcium oscillations in human granulosa-luteal cells: role of protein kinase C. *J Clin Endocrinol & Metab.* 86(2): 773-777.
- Tai CH-J, Chang S-J, Leung P & Tzeng CH-R (2004) Adenosine 5'-Triphosphate activates nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases leading to the induction of early growth response 1 and Raf expression in human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol & Metab.* 89(10): 5189-5195.
- Todorov LD, Bjur RA & Westfall DP (1994) Temporal dissociation of the release of the sympathetic co-transmitters ATP and noradrenaline. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 21:931-932.
- Troadec JD, Thirion S, Petturiti D., Bohn MT & Poujeol P (1999) ATP acting on P2Y receptors triggers calcium mobilization in primary cultures of rat neurohypophysial astrocytes (pituicytes). *Pflugers Arch.* 437(5): 745-753.
- Tu M-T, Luo S-F, Wang CH-CH, Chien CH-S, Chiu CH-T, Lin CH-CH & Yang CH-M (2000) P2Y<sub>2</sub> receptor-mediated proliferation of C<sub>6</sub> glioma cells via activation of Ras/Raf/MEK/MAPK pathway. *Br J Pharmacol.* 129: 1481-1489.
- Van Tol HTA & Bevers MM (1998) Theca cells and theca-cell conditioned medium inhibit the progression of FSH-induced meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrane granulosa. *Reprod and Dev.* 51: 315-321.
- Van Voorhis BJ (1999) Follicular Development. *Encyclopedia of Reproduction.* Vol. 2. Academia Press. 1<sup>a</sup> Ed. Editorial Board Printed in the United States of American. 377.
- Vázquez-Cuevas FG & Arellano RO (2003) El ATP apoptosis en células de la teca del folículo ovárico porcino. XLVI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas (Resumen C-99) pp. 107.
- Vázquez-Cuevas FG, Juárez B, Garay E. & Arellano RO (2006) ATP-Induced apoptotic cell death in porcine ovarian theca cell through P2X<sub>7</sub> receptor activation. *Mol Reprod Dev.* 73: 745-755.
- Verghese MV, Kneisler TB & Boucheron JA (1996) P2U agonists induce chemotaxis and actin polymerization in human neutrophils and differentiated HL60 cells. *J Biol Chem.* 271: 15597-15601.
- Vizi ES & L'abos E (1991) Non-synaptic interactions at presynaptic level. *Progr Neurobiol.* 37:145-163.
- Von Kugelgen I & Wetter A (2000) Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 362: 310-323.
- Webb RJ, Bains H, Cruttwell C & Carroll J (2002) Gap-junctional communication in mouse cumulus-oocyte complex: implications for the mechanism of meiotic maturation. *Reproduction.* 123: 41-52.
- Wright JW, Suellen T-F, Stouffer RL & Rodland KD (2002) Proliferation of rhesus ovarian surface epithelial cells in culture: lack of mitogenic response to steroid or gonadotropic hormones. *Endocrinology.* 143(6): 2198-2207.
- Yu SM, Chen SF, Lau YT, Yang CM & Chen JC (1996) Mechanism of extracellular ATP-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol.* 50: 1000-1009.
- Zafra F., Lindholm ., Lindholm D., Castris E., Hartikka J. & Thoenen H (1992) Regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth

factor mRNA in primary cultures of hippocampal neurons and astrocytes. *J Neurosci.* 12: 4793-4799.

- Zimmermann H (1994) Signalling via ATP in the nervous system. *Trends Neurosci.* 17:420-426