

Universidad Nacional Autónoma de México

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Estimulación purinérgica en las células del folículo ovárico de mamífero y su papel en la muerte celular

Tesis que para obtener el grado de Dr. en Ciencias Biomédicas presenta:
M. en C. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas

Tutor: Dr. Rogelio Arellano Ostoa

Juriquilla Qro. Abril de 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.

Esta tesis se realizó en el departamento de Neurofisiología celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Rogelio Arellano Ostoia El proyecto fue apoyado por PAPPIT-UNAM IN221902 e IX247404 y CONACYT 40167Q. El doctorante recibió una beca del CONACYT 129597 y beca complemento de DGAPA-UNAM .

Para Miriam, Jazmín y León



|

Para Beatriz

Agradecimientos

Sinceramente al Dr. Rogelio Arellano Ostoia por su confianza y apoyo en la realización de este trabajo.

A la Dra. Edith Garay por su invaluable colaboración.

A los miembros del comité tutorial: Dr. Mauricio Díaz Muñoz y Dr. Luis Vaca Domínguez por su atinadas observaciones en el desarrollo de la tesis.

A los miembros del jurado: Dra. Carmen Aceves Velasco, Dra. Carmen Clapp Jiménez-Labora, Dr. Ataulfo Martínez Torres, Dr. Julio Morán Andrade y Dr. Rafael Villalobos Molina por sus atenciones y atinadas críticas.

A los miembros de mi primer comité tutorial Dr. Alejandro Zentella Dehesa y Dr. Adolfo García Sainz por su contribución a mi formación en momentos especialmente críticos.

Agradezco el apoyo técnico de: Dra. Dorothy D. Ples, Sr. Horacio Ramírez Leyva, Dra. Anaí Antaramián Salas, Quim. Leonor Casanova Rico, Lic. Ma. de Lourdes Lara Ayala, Lic. María del Pilar Galarza Barrios, M.V.Z. Martín García Servín, M. en C. Alberto Lara Ruvalcaba, e I.S.C. Omar González Hernández.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio D-13

INDICE

Agradecimientos.....	I
Indice.....	II
Abstract.....	III
Resumen.....	IV
Introducción.....	1
La foliculogénesis y su regulación molecular.....	1
Una revisión breve de la foliculogénesis.....	3
Atresia folicular.....	6
El folículo ovárico.....	7
Evidencias de la participación del ATP en la modulación de la foliculogénesis	10
Los receptores purinérgicos.....	13
Apoptosis.....	20
Antecedentes.....	25
Hipótesis.....	26
Objetivos.....	27
Materiales y métodos.....	28
Resultados	35
Discusión.....	61
Referencias	67
Publicaciones.....	81

ABSTRACT

Folliculogenesis modulation via distinct neurotransmitters is a well-documented phenomenon. Intraovarian purinergic signaling mechanisms have been identified previously in different species. However, the molecular elements involved and the physiological role of this purinergic signaling remain to be elucidated. Here, studies using RT-PCR amplification, immunoblotting, and immunofluorescence microscopy showed that murine and porcine ovaries express the P2X₇ subtype receptor, a cationic receptor-channel operated by ATP. Using immunofluorescence it was demonstrated that P2X₇ protein expression, in both mouse and pig, occurs specifically in the theca cells from antral follicles. Isolated porcine theca cells maintained in primary cultures and tested with 1 mM ATP or 250 μM Bz-ATP, a specific agonist of P2X₇, responded with an increase in intracellular calcium concentration, as demonstrated in cells loaded with fluo-4 as calcium indicator. This strongly suggested that P2X₇ receptors in theca cells are functional. Moreover, application for 24 h of 1 mM ATP or 250 μM Bz-ATP induced apoptotic cell death as indicated by the DNA fragmentation pattern, positive TUNEL test, and annexin V binding. This ATP effect was antagonized by 300 μM PPADS and 200 μM oxidized ATP. Also, addition of 5 mM EGTA in the external medium to chelate free Ca⁺⁺ decreased death cell to 24% of that produced by 200 μM Bz-ATP, suggesting that Ca⁺⁺ influx participates in the phenomenon.

The highly specific and functional expression of P2X₇ receptors in theca cells suggests a role for ATP in modulating follicular physiology. This is the first report of functional purinergic receptors in ovarian theca cells.

RESUMEN

La modulación de la foliculogénesis por distintos neurotransmisores es un fenómeno bien documentado. En diferentes especies se han descrito procesos mediados por señalización intercelular purinérgica, no obstante, sus componentes moleculares y su papel fisiológico no han sido estudiados con detalle. En el presente trabajo se demostró utilizando RT-PCR, Western blot e inmunofluorescencia, que el ovario murino y el porcino expresan el receptor P2X₇, un receptor-canal catiónico operado por ATP extracelular. En el ovario de ratón y de cerdo la expresión del receptor P2X₇ se localiza específicamente en las células de la teca de folículos antrales. Cultivos primarios de células de la teca folicular de porcino, respondieron a ATP 1 mM o al agonista selectivo de los receptores P2X₇, Bz-ATP 250 μM, con un incremento en la concentración de Ca⁺⁺ intracelular, esto sugirió fuertemente que los receptores P2X₇ presentes en las células de la teca son funcionales. Además, la incubación con ATP 1 mM o Bz-ATP 250 μM por 24 horas indujo muerte celular apoptótica, como lo indicó la fragmentación del DNA genómico, el ensayo de TUNEL y la unión de anexina V. Este efecto fue antagonizado por PPADS 300 μM y ATP-oxidado 200 μM. Por otra parte, la adición de EGTA 5 mM al medio de cultivo, para quelar el Ca⁺⁺, disminuye la muerte celular inducida por Bz-ATP 200 μM en un 24 %, sugiriendo que el influjo de Ca⁺⁺ participa en el fenómeno.

La expresión altamente específica de los receptores P2X₇ en las células de la teca sugiere un papel para el ATP extracelular en la fisiología ovárica. Este es el primer reporte de receptores purinérgicos funcionales en las células de la teca ovárica.

INTRODUCCIÓN

La foliculogénesis y su regulación molecular

La foliculogénesis es el proceso por el cual los folículos son encausados a través de una serie de etapas de crecimiento y diferenciación hasta que un ovocito maduro es ovulado (Figura 1). Este proceso involucra el reclutamiento inicial de folículos primordiales del “pool” de reserva, el desarrollo de folículos preantrales primarios y secundarios, la formación de la cavidad antral y finalmente la selección del folículo o folículos ovulantes.

Desde el punto de vista morfológico se han establecido categorías que describen las características de un grupo de folículos en cierta etapa del proceso. El folículo primordial comprende al ovocito rodeado de una sola capa de epitelio, una vez que este epitelio cambia de forma hasta volverse columnar se considera un folículo primario. Esta capa de células prolifera y se diferencia, entonces pueden reconocerse dos tipos celulares rodeando al ovocito: las células de la granulosa organizadas en varias capas en contacto con el gameto y las células de la teca rodeando completamente el folículo, esta etapa es la de folículo secundario. Posteriormente se comienzan a formar múltiples espacios intercelulares llenos de líquido que al unirse dan lugar a la cavidad denominada antro, estos folículos se denominan antrales o folículos de Graff, de este grupo de folículos antrales el folículo o folículos dominantes serán seleccionados para ovular y el resto será eliminado mediante un proceso denominado atresia folicular. Una vez que se ha llevado a cabo la ovulación el folículo se transforma en el cuerpo lúteo, una glándula secretora de progesterona (Freeman, 1994).

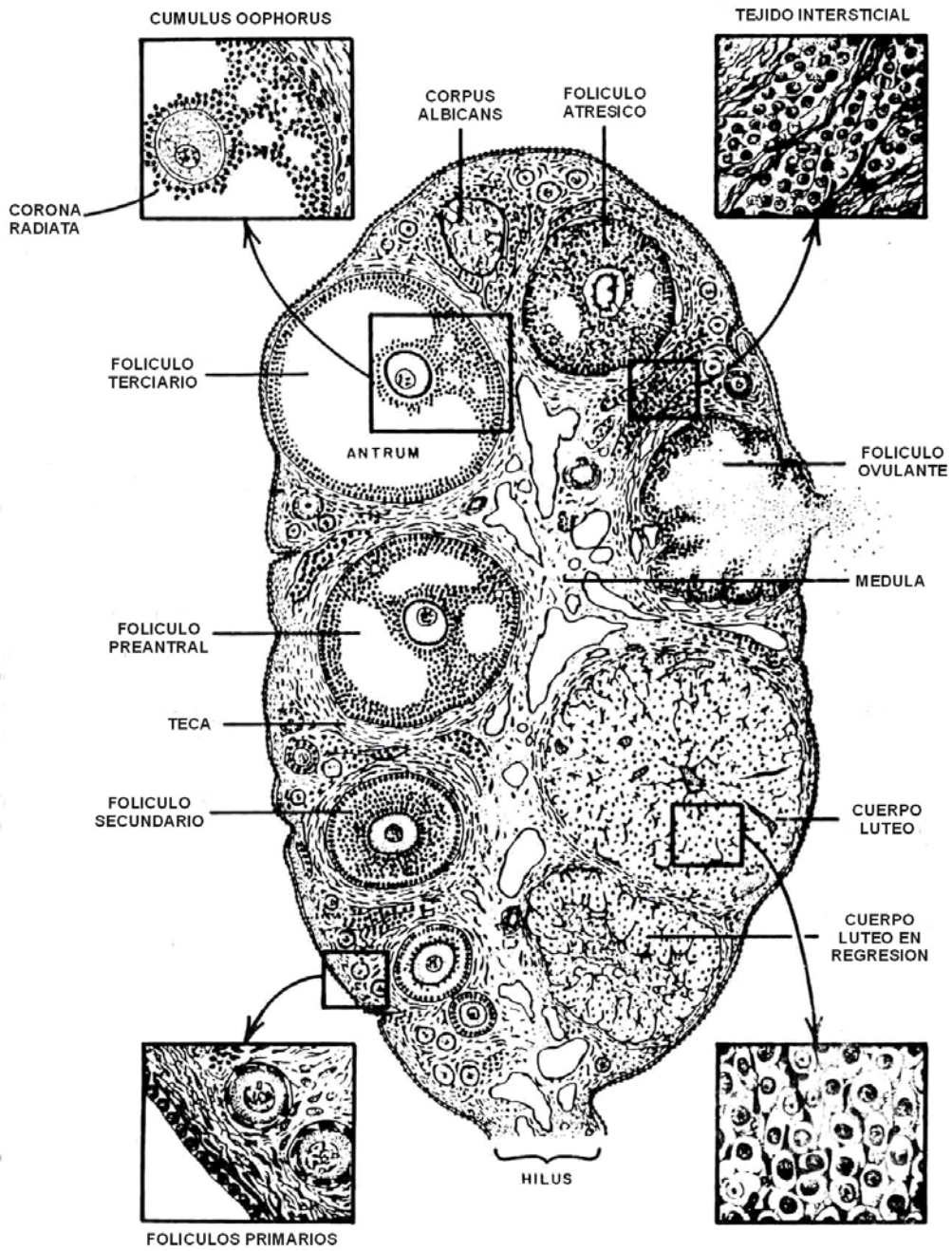


Figura 1. El desarrollo folicular en el ovario de mamífero, donde se muestra esquemáticamente las etapas de la foliculogénesis.

Esta serie de eventos involucra mecanismos de regulación hormonal ejercido por las gonadotropinas y esteroides y mecanismos de señalización intraovárica mediados por factores de crecimiento, diferenciación y neurotransmisores (Armstrong y Webb, 1997). El presente estudio se circunscribe en la búsqueda y descripción de los sistemas de comunicación celular que controlan estos eventos, particularmente del sistema purinérgico.

Una revisión breve de la foliculogénesis

Las células germinales precursoras migran del endodermo dorsal del saco de la yema durante la vida fetal hacia el surco genital donde se dividen y diferencian en ovogonias (McGee y Hsueh, 2000). Las células somáticas adyacentes que forman la granulosa se asocian con el ovocito para formar el *pool* de folículos primordiales que van a ser reclutados durante toda la vida reproductiva de la hembra.

En el ovario de mamífero en etapa perinatal los ovocitos se encuentran arrestados en el diploteno de la meiosis I, están rodeados por una sola capa de células somáticas y su desarrollo se encuentra detenido formando una reserva de folículos primordiales. Algunos folículos de esta reserva son reclutados e inician su diferenciación a folículos primarios. La foliculogénesis temprana es independiente de gonadotropinas pues el reclutamiento primario existe desde antes de la pubertad y durante la preñez y la lactancia, cuando estas hormonas cambian drásticamente su nivel de secreción (McGee y Hsueh, 2000). Una de las moléculas que regulan las fases tempranas de la foliculogénesis es c-Kit, un receptor con actividad de cinasa de tirosina de la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas, y su ligando Steel. Steel se expresa en células de la granulosa y c-Kit en el ovocito y en

células de la teca. En el ovario de ratón, mutaciones que afectan la expresión de la forma soluble de Steel carecen de crecimiento folicular y no puede alcanzar la etapa de folículo primario (Huang et al.,1993; Bedell et al.,1995). Por otra parte existe evidencia de que moléculas de la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) como la hormona anti-mulleriana (AMH), GDF-9 y BMP-15 (GDF-9b), están involucradas en la regulación temprana de la foliculogénesis (Dong *et al.*,1996).

Durante el desarrollo del folículo primario y hasta alcanzar la etapa de preovulatorio es necesario que se establezca una comunicación estrecha entre las células de la granulosa y el ovocito, ya que estas células regularán de manera importante la diferenciación del gameto en etapas subsecuentes. Estudios realizados en ratones demuestran que el correcto desarrollo del folículo depende de las uniones comunicantes (uniones gap) que unen al ovocito con las células que le rodean. Así, mutaciones en la conexina 37, que forma parte de las uniones gap y se expresa en el folículo primario tardío, arrestan el crecimiento folicular antes de alcanzar el estadio secundario (Simon *et al.*,1997).

En esta misma etapa se sabe que la acción de activina, una molécula de la familia de TGF- β estimula la proliferación de células de la granulosa. Ratones “*knock-out*” para el receptor IIB de activina arrestan el desarrollo folicular en la fase antral temprana (Nishimori y Matzuk, 1996). Varias evidencias muestran que esta regulación se da modulando la expresión de receptores a FSH en las células de la granulosa indiferenciadas (Revisado en Frindlay *et al.*,2002), este hecho es muy importante en la foliculogénesis pues puede explicar como surge la sensibilidad a gonadotropinas conforme el folículo avanza en se desarrollo de preantral a antral. También se ha demostrado que en células de la granulosa

no luteinizadas la activina puede aumentar la actividad de la citocromo P450 aromatasas y por ende la producción de estradiol (Eramaa *et al.*, 1995).

En la diferenciación a folículos antrales se ha demostrado que interviene el sistema del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) (Silva y Price, 2002). En coincidencia con estos datos, ratones *Knock-out* para el ligando IGF-I presentan un desarrollo folicular temprano normal, pero no presentan folículos antrales, estos animales son incapaces de ovular en respuesta a un estímulo con gonadotropinas exógenas, debido a que en folículos preantrales la expresión de receptores a FSH está severamente reducida (Zhou *et al.*, 1997).

Durante estas fases de crecimiento también se está llevando a cabo el proceso de selección, algunos folículos son seleccionados y estos modulan el crecimiento de los otros folículos subordinados. Los folículos dominantes secretan estrógenos e inhibina A que inhiben la secreción de FSH arretando el crecimiento de los otros folículos hasta que alcanzan la etapa antral. Como resultado de la selección, la mayor parte de estos folículos experimentará atresia y sólo sobrevivirá uno o algunos folículos dominantes según la especie (McGee y Hsueh, 2000). En el establecimiento y mantenimiento de la dominancia parecen actuar varios mecanismos coordinadamente.

En la última fase de la foliculogénesis la elevada secreción de estrógenos por parte del folículo dominante dispara el pico preovulatorio de LH. LH actúa sobre el folículo preovulatorio para terminar el programa de expresión génica asociado al crecimiento folicular (Richards *et al.*, 2002). Así, los genes que regulan la proliferación de células de la granulosa como IGF-I (Zhou *et al.*, 1997), el receptor de FSH (Richards *et al.*, 1979), el receptor a estrógenos (Sharma *et al.*, 1999), ciclina D2 (Robker y Richards, 1998) y otros, son rápidamente apagados. Al mismo tiempo, LH induce la expresión de genes involucrados en la ovulación, entre estos están el receptor a progesterona (Park y Mayo,

1991), la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Sirois y Richards, 1993) y el péptido activador de la adenilato ciclasa en la pituitaria (PACAP) (Park *et al.*,2000). Una vez puesta en marcha esta maquinaria el ovocito saldrá del arresto meiótico y llegará a la ovulación (Revisado en Richards *et al.*,2002).

Atresia folicular

El 99% de los folículos primordiales presentes en el ovario de mamífero al momento del nacimiento sufrirán atresia folicular. La atresia es una degeneración ordenada que involucra apoptosis de las células somáticas y germinales presentes en el folículo y se presenta en todas las etapas del crecimiento folicular (Hsue *et al.*,1994). Particularmente, el 50% de los folículos antrales sufrirá atresia (Greenwald y Roy, 1994). De acuerdo con este esquema, el estudio de los mensajeros celulares que participan en la regulación de la foliculogénesis se ha enfocado en moléculas que promueven la sobrevivencia del folículo. La principal señal de escape a la atresia está dada por las gonadotropinas, en particular la FSH (Braw y Tsafiriri, 1980), sin embargo, este es un proceso que involucra múltiples vías de señalización además de las gonadotropinas como las hormonas esteroides (Peluso, 1997) y componentes de la cascada de señalización del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) (Guthrie *et al.*,1998; Wandji *et al.*,1998).

El papel de los diferentes tipos celulares del folículo en la atresia es fundamental para comprender la regulación de este proceso. Trabajos pioneros describen que las células de la teca de los folículos atrésicos se hipertrofian y se incorporan al tejido intersticial (Himmelstein-Braw *et al.*,1976). Sin embargo, con base en estudios morfológicos se ha demostrado que estas células presentan pignosis nuclear, una evidencia de la condensación

del DNA (O'shea *et al.*, 1978). Recientemente se ha demostrado que las células de la teca de folículos atrésicos de varias especies de mamífero como cerdo, vaca y rata experimentan apoptosis (Tilly *et al.*, 1992; Palumbo y Yeh, 1994; Isobe y Yoshimura, 2000).

El folículo ovárico

El folículo es la unidad funcional del ovario, su papel primordial es liberar al ovocito capaz de ser fecundado y secretar hormonas que regulan el crecimiento y la diferenciación de los órganos del aparato reproductor.

El folículo está formado por el ovocito, una membrana basal que aísla a las células de la granulosa del resto de los componentes del ovario y las células de la teca que forman una lámina de tejido que rodea al folículo denominada teca interna (Figura 2). Además de las células de la granulosa y las de la teca, el folículo está rodeado por un complejo sistema de fibras de colágena, células de tejido conectivo y fibras de músculo liso, este conjunto de elementos recibe el nombre de teca externa (Richards, 1979). El ovocito y las células de la granulosa no reciben riego sanguíneo ni inervación en forma directa.

El ovocito de mamífero es una célula cuyo tamaño varía entre 20 y 70 μm de diámetro. Presenta numerosas microvellosidades que se interdigitan con prolongaciones de las células de la granulosa que le rodean. En el folículo con antra estas células forman el denominado cúmulus, el cual es expulsado junto con el ovocito en el momento de la ovulación. Entre el ovocito y las células del cúmulus se encuentran numerosas uniones comunicantes, que son fundamentales para la comunicación celular (Bjersing, 1978).

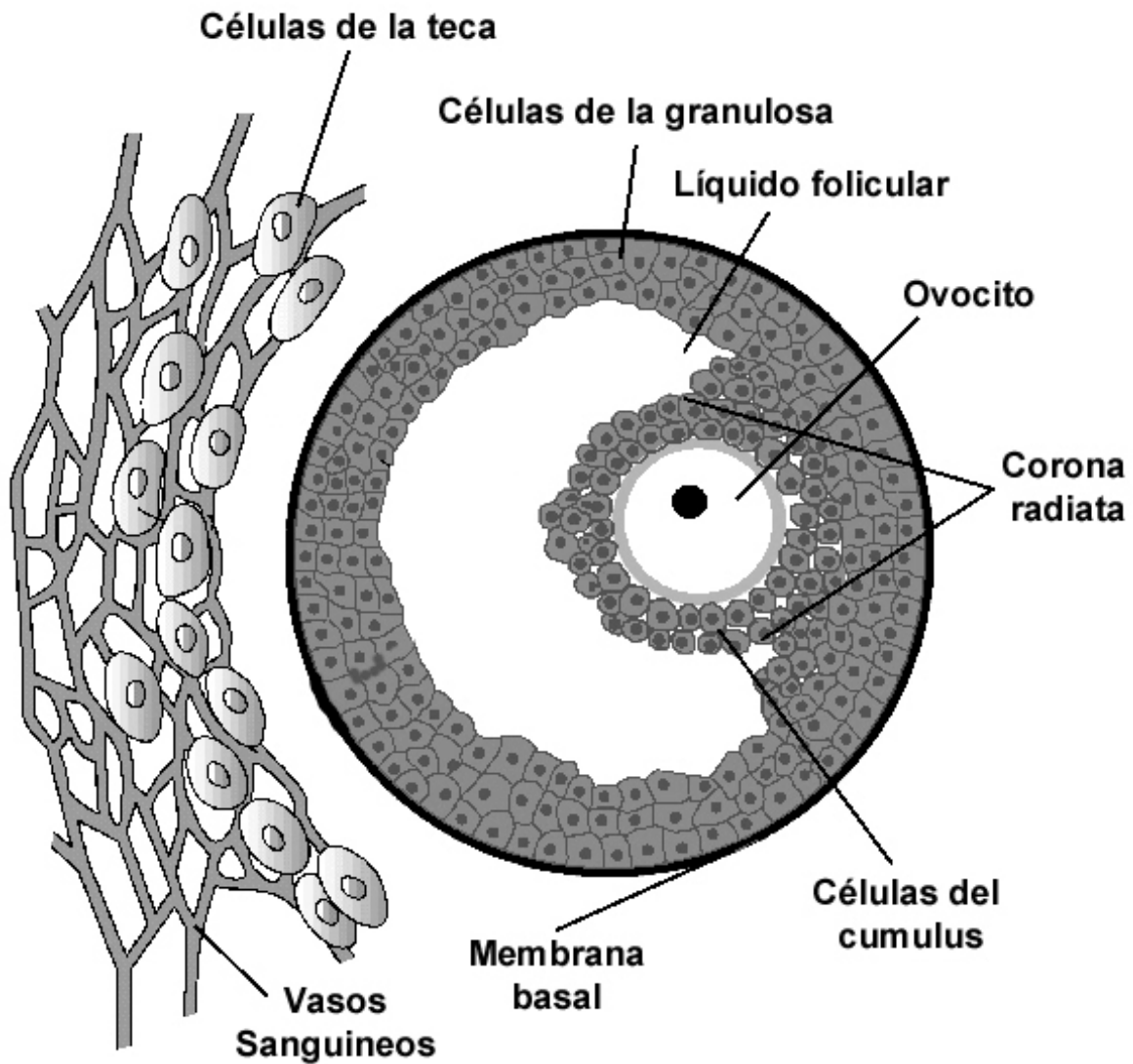


Figura 2. El folículo ovárico. En esta estructura se observa al gameto rodeado por células especializadas, como las células de la granulosa y las células de la teca, así como su organización general.

Después del nacimiento, el ovocito se encuentra en la etapa de diploteno de la primera profase de la meiosis. Antes de que se lleva a cabo la ovulación el ovocito completa la primera fase de la meiosis, en este estadio es ovulado.

Las células de la granulosa forman una capa continua que rodea completamente al ovocito y lo aísla del resto del ovario, estas células presentan uniones comunicantes entre ellas y se encuentran acopladas eléctricamente (Hsueh et al.,1983a). En el folículo en crecimiento, las células de la granulosa proliferan rápidamente por estímulo de la FSH y los estrógenos. Durante la mayor parte de la foliculogénesis las células de la granulosa sólo poseen receptores a FSH, pero al acercarse la ovulación expresan receptores a LH y a prolactina (Richards, 1979).

Existen evidencias que demuestran que la población de células de la granulosa es heterogénea y que están especializadas (Kason et al.,1985). Por ejemplo, no todas las células de la granulosa poseen receptores a la LH, ni todas se transforman en células luteínicas después de la ovulación. Las células cercanas a la membrana basal contienen un número mayor de receptores a LH que las que están cerca de la cavidad antral y son más activas en la producción de hormonas esteroideas, siendo mayor su concentración de 3β -ol-hidroxiesteroide deshidrogenasa- $\Delta 5$ -isomerasa. Por el contrario las células cercanas al antro expresan un mayor número de receptores a prolactina (Dunaif et al.,1982). Por su parte, las células que rodean al ovocito y forman el cúmulus expresan miosina mientras las otras no (Amenta y Cavalotti, 1980). *In vitro* las células de la granulosa se transforman, el cambio más importante es la producción de progesterona y disminuyen su capacidad para aromatizar andrógenos, este proceso se conoce como luteinización (Hsueh et al.,1983).

Las células de la teca presentan características de células secretoras de hormonas esteroideas como abundante retículo endoplásmico liso y mitocondrias con crestas tubulares; las que están cerca de la membrana basal presentan nexos. La teca recibe riego sanguíneo directo y múltiples terminaciones nerviosas colinérgicas y adrenérgicas. En el folículo en crecimiento, las células de la teca sintetizan andrógenos, que sirven de sustrato a las células de la granulosa para la síntesis de estrógenos. En el folículo preovulatorio, las células de la teca pierden la capacidad de síntesis de andrógenos y secretan progesterona (Bjersing, 1978).

Evidencias de la participación del ATP en la modulación de la foliculogénesis

Actualmente está bien establecido que el ATP es coliberado con otros neurotransmisores en el sistema nervioso central y periférico (Burnstock, 1999). La coliberación de ATP con norepinefrina (NE) por la inervación simpática se ha demostrado y se ha estudiado con detalle en el modelo de la sinapsis neuromuscular del *vas deferens* en varios roedores (Westfall *et al.*, 2002). Se ha descrito que el ATP actuando sobre receptores-canal P2X induce una entrada rápida de Ca^{++} que produce una primera contracción del músculo, posteriormente la NE induce un aumento tónico de Ca^{++} dependiente de IP_3 vía la activación de receptores α_1 -adrenérgicos. Además diversos estudios han demostrado que en las terminales nerviosas la NE y el ATP se acumulan en las mismas vesículas y son liberados simultáneamente en la misma proporción (Brock y Cunnane 1989; Gordon, 1986).

El ovario está inervado por componentes simpáticos y parasimpáticos del sistema nervioso autónomo, los cuales penetran al ovario por el plexo hiliar perivascular. La

inervación simpática es aportada por el plexo ovárico, que es una rama de los plexos aórtico y renal; y por el nervio ovárico superior que se origina a partir del ganglio celiaco (Burden, 1985). Se ha descrito que los principales neurotransmisores que están presentes en el plexo ovárico son la sustancia P (SP) y la noradrenalina; mientras que por el nervio ovárico superior transcurre principalmente el neuropéptido Y (NPY), el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y la noradrenalina (NA) (Lawrence y Burden, 1980). Por estudios de inmunohistofluorescencia se ha demostrado que los plexos nerviosos están estrechamente relacionados con los folículos primordiales y con folículos en desarrollo, haciendo contacto con las células de la teca y el músculo liso perifolicular pero sin entrar a las células de la granulosa ni a los cuerpos luteos (Burden, 1985).

Por otra parte, el ATP podría ser secretado por las células del folículo y actuar de manera parácrina. Así, se ha demostrado que en una amplia variedad de tipos celulares la estimulación mecánica y el estrés hipotónico inducen la liberación de ATP al medio extracelular (Bodin y Burnstock, 2001).

Estudios previos han demostrado que varios subtipos de receptores a ATP son expresados por el ovario de mamífero. Se ha establecido la existencia de receptores a ATP en las células de la granulosa del folículo de mamífero (Kamada *et al.*,1994 ; Tai *et al.*,2000 ; Arellano *et al.*,2002 ; Webb *et al.*,2002). En el ovocito rodeado por las células del cumulus (CEO por *cell enclose oocyte*) los agonistas de los receptores P2 activan dos corrientes iónicas, la primera es una corriente de Cl^- dependiente de Ca^{++} y la segunda corresponde a la apertura de canales de Ca^{++} permeables a Na^+ . En este estudio las corrientes se registraron por electrodos colocados en el ovocito y ambas fueron bloqueadas por el desacoplamiento de las uniones comunicantes, lo cual permite establecer que las corrientes se generan por receptores localizados en las células del cumulus y el mensaje

llega al ovocito por estas uniones (Arellano *et al.*,2002). Estudios de microscopía confocal han permitido establecer que la estimulación del CEO con ATP genera una onda de calcio que se origina en las células del cumulus y difunde hasta el ovocito a través de las uniones GAP (Webb *et al.*,2002). Se ha demostrado que en estas respuestas participa el receptor P2Y₂ (Arellano *et al.*,2002). Estos hallazgos permiten proponer que el ATP está modulando la maduración meiótica del ovocito por medio de las células del cumulus.

En particular, en nuestro laboratorio se han detectado en cDNAs de células de la granulosa del ovario de ratón los transcritos de los receptores P2Y₂, P2Y₄, P2X₂, P2X₄ y P2X₇, además hay evidencias claras de que la diversidad podría ser aún mayor e incluir varias proteínas generadas por *splicing* alternativo (Garay y Arellano, 2001).

En cultivos primarios de células granulosa-luteales humanas se ha propuesto que la activación de receptores P2Y₂ (P2U) regula de manera negativa la producción de AMP cíclico (cAMP) activada por LH, al parecer este efecto depende de la activación de la proteína cinasa C α (PKC α) (Tai *et al.*,2001a). En este mismo sistema se ha mostrado que el ATP es capaz de activar a la MAPK p42 y p44 (Tai *et al.*,2001b). Estas evidencias sugieren que el ATP participa en la regulación de la fisiología del folículo ovárico. Cabe mencionar que no existen reportes acerca de la expresión y función de receptores P2 en las células de la teca ovárica de mamífero, en el presente estudio se presenta la primera evidencia de la expresión y funcionalidad de un receptor P2X en este tipo celular, abriendo una brecha para el estudio del sistema purinérgico en la fisiología ovárica.

Los receptores purinérgicos

Los nucleótidos, ADP, ATP, UDP y UTP y el nucleósido adenosina son mensajeros celulares importantes que actúan a través de receptores específicos de membrana. Existen dos principales familias de receptores para estas moléculas: P1, que son específicos para adenosina y P2 cuyos ligandos son principalmente ATP y UTP. Los receptores P2 se agrupan en dos familias, de acuerdo a su estructura molecular y a su mecanismo de acción: P2Y, que son receptores acoplados a proteínas G, y P2X que son canales catiónicos no selectivos (Ralevic y Burnstock, 1998). En el presente trabajo se hará referencia únicamente a los receptores P2.

Receptores P2Y

Los receptores P2Y son receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (GPCR), a la fecha se han clonado 5 subtipos P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ y P2Y₁₁.

Estructura general: Son proteínas formadas de 308 a 377 aminoácidos, con una masa molecular de 41 a 53 kDa, su estructura tridimensional corresponde a la clase 1 de la superfamilia de GPCR. Así, estudios de modelaje molecular con el receptor P2Y₁ utilizando como modelo a la rodopsina, han descrito la presencia de aminoácidos cargados positivamente en los transmembranales 3, 6 y 7 que pueden estar involucrados en la interacción con los fosfatos del ATP; estudios de mutagénesis dirigida con el receptor P2Y₂ contra aminoácidos de los transmembranales 6 y 7, cargados positivamente, demostraron que al sustituirlos por aminoácidos neutros la potencia del receptor disminuye

entre 100 y 850 veces (Erb *et al.*, 1995). Estas evidencias sugieren que del mismo modo que en otros GPCR los transmembranales pueden estar formando una cesta, que es el sitio de interacción con el ligando.

Vías de transducción activadas por los receptores P2Y: Los receptores P2Y₁ y P2Y₂ son prototípicos para esta familia, están acoplados a proteínas G heterotriméricas cuya subunidad α es del tipo G_{q/11} insensible a la toxina pertussis y a la toxina del cólera. Su principal efector es la fosfolipasa C β (von Kügelgen y Wetter , 2000), que al activarse hidroliza al fosfolípido de membrana fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂) y genera los segundos mensajeros inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ actúa sobre su receptor, localizado en el retículo endoplásmico, promoviendo la liberación de Ca⁺⁺ al citosol y el DAG activa a la proteína cinasa C (PKC), una cinasa de serina-treonina con múltiples blancos celulares (Ralevic y Burnstock, 1998). Además, se ha descrito que estos receptores pueden acoplarse a proteínas G inhibitoras de la adenilato ciclasa (G_i) sensibles a la toxina pertussis (Boyer *et al.*, 1993), cuya activación induce disminución de la concentración citoplasmática de AMP cíclico (cAMP).

Por otra parte, el complejo $\beta\gamma$ de las proteínas G heterotriméricas ejerce importantes acciones celulares. Por ejemplo, se ha mostrado que en neuronas del cerebelo de rata la estimulación del receptor P2Y₁ es capaz de inducir una corriente saliente de K⁺, por acción directa del complejo $\beta\gamma$ de la proteína G acoplada al receptor con el canal iónico (Ikeuchi y Nishizaki, 1996).

Farmacología: Los datos farmacológicos sobre esta familia de receptores abren líneas de análisis sobre la especificidad y sensibilidad en condiciones fisiológicas. De este modo, el receptor P2Y₁ y el P2Y₁₁ responden principalmente a ATP y UTP es poco potente; por otra

parte el estudio de los subtipos P2Y₄ y P2Y₆ han mostrado que responden principalmente a nucleótidos de uridina UTP y UDP; para el subtipo P2Y₂ ATP y UTP tienen un efecto similar. Estos datos sugieren una gran especificidad fisiológica en la señalización por nucleótidos y pueden ayudar a comprender fenómenos como la coexpresión de receptores en determinados tejidos y su regulación (Ralevic y Burnstock, 1998). A continuación se resumen los receptores P2Y que se han clonado.

Receptor	Tejido	Potencia de agonistas
P2Y ₁	Cerebro humano Ovario humano Endotelio Bovino	2MeSATP>ATP>UTP
P2Y ₂	Células epiteliales humanas Pituitaria de rata	ATP=UTP>>2MESATP
P2Y ₄	Placenta humana Corazón de rata	UTP>ATP=ADP
P2Y ₆	Placenta humana Músculo liso de la aorta de rata	UDP>UTP>ADP
P2Y ₁₁	Placenta humana	ATP>2MeSATP>>>ADP

Tabla 1. Receptores P2Y que han sido clonados y la potencia de sus principales agonistas (Modificado de Ralevic y Burnstock, 1998).

Importancia fisiológica: En general algunos subtipos de receptores P2Y están ampliamente distribuidos, se han descrito, molecularmente o farmacológicamente, en células de una amplia variedad de tejidos, sin embargo sus acciones en la fisiología celular no han sido totalmente exploradas.

El transcrito del receptor P2Y₁ de rata ha sido detectado en corazón, cerebro, vejiga, pulmón, hígado, músculo esquelético y riñón (Tokuyama *et al.*, 1995). Por otra parte, se han descrito farmacológicamente en una gran variedad de órganos y tejidos, por ejemplo, en astrocitos de rata, eritrocitos de pavo, osteoblastos de rata y células β-pancreáticas (revisado en Ralevic y Burnstock, 1998). Entre sus acciones fisiológicas se sabe que regulan la secreción de insulina en las células β-pancreáticas (Bertrand *et al.*, 1987), la glucogenolisis en hepatocitos de rata (Keppens y De Wulf, 1991) y la regulación de la tensión del músculo liso vascular, uno de sus efectos más estudiados (Kennedy y Burnstock, 1985; Burnstock y Warland, 1987).

El otro miembro de este grupo que ha sido estudiado con detalle es el receptor P2Y₂. El transcrito del receptor P2Y₂ de ratón ha sido detectado por northern blot en bazo, testículo, riñón, hígado, pulmón, corazón y cerebro (Parr *et al.*, 1995). En rata se le ha descrito en cultivos primarios de células del músculo liso de aorta (Chang *et al.*, 1995), en miocitos cardiacos y fibroblastos (Webb *et al.*, 1996). Por otra parte, farmacológicamente se ha caracterizado en diferentes tipos de células sanguíneas, en células cromafines, células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos, células gliales, hepatocitos, queratinocitos, osteoblastos, células β-pancreáticas e hipófisis (revisado en Ralevic y Burnstock, 1998).

Se ha demostrado que los receptores P2Y₂ presentes en el endotelio estimulan la síntesis y liberación de prostaciclina, y óxido nítrico (NO) permitiendo la vasodilatación (Ralevic y Burnstock, 1998). En cultivos celulares de músculo liso de aorta se ha mostrado que el receptor P2Y₂ modula la expresión de genes dependientes del ciclo celular (Malam-Souley *et al.*, 1996).

Receptores P2X

A la fecha se conocen siete genes que codifican para subunidades de receptores P2X, se sabe que los transcritos de la mayoría de las subunidades pueden experimentar *splicing* alternativo. Por ejemplo, de la subunidad P2X₁ de rata se han reportado dos formas alternativas, en una de ellas el exon 6 ha sido eliminado (Ohkubo *et al.*,2000) y en otra se excluyen los exones 1 y 6 (Owens *et al.*,1991). El P2X₂ de humano tiene 5 variantes reportadas y el P2X₄ de ratón 4 (revisado en North, 2002), de esta forma la diversidad de proteínas aumenta considerablemente.

Estructura general: Las subunidades P2X son proteínas de 384 (P2X₄) a 595 (P2X₇) aminoácidos (aa). Cada una posee dos regiones hidrofóbicas que presumiblemente corresponden a regiones transmembranales (Brake *et al.*,1994). En el caso de la subunidad P2X₂ que se considera prototípica, el primer transmembranal se ha mapeado entre los aa 30 a 50 y el segundo entre los aa 330 a 353, los aminoácidos entre estos dominios forman un asa extracelular; de acuerdo a estudios donde se ha expresado a la subunidad P2X₂ en tandem, los extremos amino y carboxilo son citoplásmicos (Newbolt *et al.*,1998). La similitud en la secuencia de aminoácidos entre las 7 subunidades conocidas varía entre 40 y 55% comparando la región de los transmembranales y el asa extracelular (North, 2002). Todas las subunidades P2X poseen varios sitios consenso de N-glicosilación N-X-S/T, y algunos son esenciales para el tráfico del receptor a la membrana plasmática. En el caso de la subunidad P2X₂ que posee tres sitios (N182, N239 y N298), se ha demostrado por estudios de mutagénesis dirigida que si dos o tres de estos sitios están glicosilados el receptor es funcional, si se conserva un solo sitio glicosilado las corrientes detectadas son

muy pequeñas y si ningún sitio se conserva, el receptor no es funcional (Newbolt *et al.*,1998).

Es muy probable que la estequiometría de un canal P2X funcional sea trimérica o hexamérica, aproximaciones bioquímicas analizando multímeros de la subunidad P2X1 por electroforesis en condiciones no desnaturizantes apoyan esta idea; además se ha mostrado que los residuos críticos para la multimerización están en los dominios transmembranales (Torres *et al.*,1999). La formación de multímeros puede ser homomérica o heteromérica, considerando varios estudios se ha determinado que pueden formarse las combinaciones P2X₂/P2X₃ (Radford *et al.*,1997), P2X₄/P2X₆ (Le *et al.*,1998) y P2X₁/P2X₅ (Torres *et al.*,1998) por su parte, la subunidad P2X₅ puede formar multímeros con todas las demás y P2X₇ únicamente forma homómeros (North, 2002).

Farmacología: De manera general todos los receptores P2X responden a ATP y ATP γ S, y son antagonizados por suramina y PPADS (North, 2002), sin embargo existen diferencias en la potencia de activación o inhibición de otros ligandos. Por otra parte, los heterómeros funcionales tienen características farmacológicas propias. Dada la amplitud de esta familia de receptores algunos datos fundamentales se resumen en la tabla 2.

Receptor	Tejido	Agonistas	Antagonistas
P2X ₁ monomérico	Vasos deferentes de rata	ATP = $\alpha\beta\text{meATP}$	MRS2220 NF023 Ip5I
P2X ₂ monomérico	Hipófisis humana Células PC12 de rata	ATP >>> $\alpha\beta\text{meATP}$ ATP _{EC50} =10 μM Desensibilización lenta >10 s	Cationes divalentes Mn ⁺⁺ >Mg ⁺⁺ >Ca ⁺⁺ >Ba ⁺⁺
P2X ₃ monomérico	Ganglio dorsal de rata Corazón humano Pez cebra	ATP = $\alpha\beta\text{meATP}$ = 2-MeSATP Desensibilización rápida <100 ms	NF023 IP5I
P2X _{2/3} heteromérico	Coexpresados en células de insecto coinmunoprecipitan	ATP = $\alpha\beta\text{meATP}$ Desensibilización lenta >10 s	TNP-ATP (IC ₅₀ ~3 nM)
P2X ₄ monomérico	Ganglio cervical superior, cerebro y células pancreáticas de rata. Humano, ratón	ATP, potenciación con ivermectina Desensibilización lenta (5-10 s)	Mg ⁺⁺ (2-10 mM) Insensible a PPADS o suramina
P2X ₅ monomérico	Ganglio celiaco y corazón de rata Músculo esquelético de pollo	ATP	
P2X _{1/5} heteromérico	Coexpresados en ovocitos o en células HEK coinmunoprecipitan	ATP (3-10 nM) =2MeSATP > $\alpha\beta\text{meATP}$ > ATP γS Desensibilización lenta a concentraciones <300 nM de ATP.	Sensible a pH TNP-ATP (IC ₅₀ ~720 nM)
P2X ₆ monomérico	Ganglio cervical superior y cerebro de rata. Linfocitos humanos	ATP no induce respuesta	
P2X _{2/6} heteromérico	Coexpresados en células HEK 293 coinmunoprecipitan	ATP	
P2X _{4/6} heteromérico	Coexpresados en ovocitos coinmunoprecipitan	ATP	
P2X ₇ monomérico	Cerebro de rata Monocitos de humano Glía de ratón	BzATP > ATP en altas concentraciones Desensibilización muy lenta	Cationes divalentes Ca ⁺⁺ >Mg ⁺⁺ >Zn ⁺⁺ >Cu ⁺⁺ ATP oxidado (100 μM) Calmidazolium (10nM) KN-62

Tabla 2. Receptores P2X (Modificado de North, 2002)

Apoptosis

La apoptosis es un proceso genéticamente regulado y finamente organizado de muerte celular esencial para el desarrollo, la embriogénesis y la homeostasis de organismos multicelulares (Raff et al.,1993). Este proceso se presenta durante el desarrollo y la fisiología de organismos tan variados como nematodos, insectos, mamíferos y plantas. Las alteraciones en este proceso celular traen consigo consecuencias graves para los organismos, por ejemplo, en humanos enfermedades como el cancer, las enfermedades autoinmunes y la enfermedades neurodegenerativas están relacionadas con disfunción de la apoptosis (revisado en Thompson, 1995).

La muerte celular apoptótica se caracteriza por una serie de eventos interconectados, como la formación de vesículas en la membrana plasmática, la condensación de la cromatina y la degradación del DNA. En la mayoría de los casos ocurre una degradación selectiva de sustratos esenciales ejecutadas por una familia de proteasas de cisteína denominadas caspasas (Nicholson y Thornberry, 1997). La proteólisis mediada por caspasas generalmente resulta en la inactivación y degradación del sustrato, por ejemplo de enzimas involucradas en la reparación del DNA como DNA-PK, PARP o topoisomerasa-I. Por el contrario, en algunos casos el corte por caspasas activa a sus sustratos como consecuencia de la degradación de subunidades inhibitoras, tal es el caso de CAD, PAK2 y Bid. Otros sustratos reconocidos de estas proteasas son proteínas estructurales como gelsolina, fodrina y cateninas; así como proteínas de la matriz nuclear como lamina A y B1, proteínas involucradas en la transducción de señales como Raf-1, y precursores de citosinas como proIL β y proIL16 (revisado en Pinton *et al.*,2001).

Caspasas

Existen catorce miembros de esta familia de proteasas. Las caspasas se sintetizan como zimógenos (procaspasas) con tres regiones principales: Un prodominio, una subunidad larga y una subunidad corta. Las subunidades larga y corta son liberadas por proteólisis en dos aspartatos [Asp(p1)-X(P1')]; los fragmentos generados se asocian para formar dímeros o tetrameros, los cuales son las formas activas de estas enzimas. Además presentan transactivación, las procaspasas pueden ser cortadas por otras caspasas en el sitios Asp-X, por ejemplo caspasa 9 activa a la procaspasa 3, y la caspasa 3 a la procaspasa 6 (Earnshaw, 1999).

Con base en sus prodominios pueden distinguirse dos clases de caspasas: La clase I o caspasas regulatorias con prodominios largos, a este grupo pertenecen las caspasas 1, 2, 4, 5, 8, 9,10, 11, 12 y 13 y actúan en las etapas de reclutamiento y activación . La clase II o caspasas ejecutoras, donde puede ubicarse a las caspasas 3,6, 7 y 14 que se caracterizan por poseer prodominios cortos (Earnshaw, 1999).

El papel de la mitocondria en la inducción de apoptosis

La mitocondria juega un papel muy importante en la regulación de la apoptosis pues puede liberar factores proapoptóticos con citocromo C, el factor inductor de apoptosis (AIF) y Smac/DIABLO. El más conocido de estos factores proapoptóticos es el citocromo C; esta proteína se transloca del espacio intermembranal de la mitocondria al citoplasma, formando un complejo con Apaf-1 (el homólogo de mamíferos de Ced-4) y la procaspasa-9, la caspasa se activa, y esta a su vez activa a la procaspasa-3 (Li *et al.*,1997; Zou *et al.*,1997).

La flavoproteína AIF es una oxidoreductasa sintetizada en el citosol e importada al espacio intermembranal de la mitocondria; *in vitro*, la adición de AIF induce condensación de la cromatina y fragmentación de DNA (Susin et al 1999), se ha propuesto que durante la apoptosis AIF es liberado al citoplasma para ejercer sus efectos. Smac/DIABLO (Du *et al.*,2000; Verhagen *et al.*,2000) es otra proteína que se localiza en el espacio intermembranal de la mitocondria y cuando es liberado induce apoptosis secuestrando a las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP's) permitiendo la liberación de Apaf-1 y procaspasa-9 y consecuentemente la activación del apoptosoma.

Además, existen otras proteínas relacionadas a la mitocondria que participan en la regulación de la apoptosis, la familia de Bcl-2. En esta familia existen miembros proapoptóticos (Bad, Bak, Bax, Bik, Bid, Bcl-X_S) y antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-X_L,Mcl-1) (revisado en Adams y Cory, 1998). Debido a que algunas de estas proteínas son capaces de formar poros en las membranas lipídicas se ha sugerido que pueden participar en el control de la permeabilidad mitocondrial, por ejemplo, durante el proceso apoptótico Bid es activado por la caspasa-8, así, la forma inactiva p22 es procesada para generar a la p15 y p11, p15 puede translocarse a la mitocondria e inducir la liberación de citocromo C (Kim *et al.*,2000).

Se ha propuesto que el proceso apoptótico es precedido por alteraciones en el potencial transmembranal de la mitocondria, estos cambios producen la formación de un canal multiprotéico denominado poro de transición (revisado en Bernardi, 1998) en regiones de la mitocondria donde la membrana interna y la externa están en contacto. Se ha propuesto que por este poro se liberarían los factores proapoptóticos residentes en la mitocondria, aunque aun existe controversia al respecto.

El Ca⁺⁺ y la apoptosis

Actualmente diversas evidencias apoyan la idea de que el Ca⁺⁺ actúa como un regulador de la sobrevivencia celular en determinadas condiciones fisiológicas. Cuando los mecanismos que regulan la homeostasis de Ca⁺⁺ se alteran irreversiblemente, la célula queda comprometida y los mecanismos de apoptosis se activan. Por ejemplo, la adición de taspigargina, una droga que inhibe la Ca⁺⁺-ATPasa del retículo endoplásmico provocando así la acumulación de Ca⁺⁺ en el citoplasma, induce apoptosis en varios tipos celulares (Bian *et al.*,1997) . En contraparte, la sobreexpresión en neuronas de la proteína secuestradora de Ca⁺⁺ calbindina-D28K, protege a las células de la inducción de apoptosis por presenilina I (Guo *et al.*,1998).

Por otra parte, se piensa que las acciones del Ca⁺⁺ como modulador de apoptosis pueden ser explicadas por su efecto sobre la permeabilidad de la mitocondria (Berridge *et al.*,1998: Bernardi , 1999). La liberación de proteínas proapoptóticas en respuesta a concentraciones elevadas de Ca⁺⁺ estaría mediada por la activación del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (revisado en Bernardi, 1998). Se ha propuesto que la conductancia de este poro de transición se modifica de acuerdo al contexto celular, así, durante la vida de la célula el poro se encontraría en un estado de baja conductancia permeable a moléculas pequeñas como iones Ca⁺⁺. Por otra parte puede adoptar un segundo estado de alta conductancia que permitiría el flujo de moléculas de mayor tamaño como factores proapoptóticos. Se ha propuesto que el cambio del estado de baja a alta conductancia es un proceso irreversible que depende estrictamente de la saturación de sitios de unión a Ca⁺⁺ en la cara interna del propio poro. Si una mitocondria enfrenta la activación

del estado de alta conductancia del poro de transición, liberará factores inductores de apoptosis (Ichas y Mazat, 1998).

ANTECEDENTES

Aunque existen algunos reportes de la expresión de receptores P2 en el ovario, el sistema purinérgico se ha estudiado someramente y aún no se han establecido funciones específicas para este sistema en la fisiología ovárica. Además no existen reportes en células de la teca folicular.

En nuestro laboratorio, el estudio de la distribución de los transcritos de receptores P2 en el ovario de ratón utilizando la técnica de hibridación *in situ* con ribosondas ha permitido detectar la expresión de los receptores P2Y₂ y P2X₄ en rebanas de tejido. Además, utilizando técnicas de inmunohistoquímica, hemos detectado las proteínas de la subunidad P2X₄ y P2X₇. En particular sabemos que el receptor P2X₇ se expresa abundantemente en las células de la teca de folículos antrales en el ovario de ratón en el día del estro, este será uno de los hechos que escrutaremos más a fondo con el objetivo de entender al menos una de sus implicaciones fisiológicas.

Debido a que existen reportes de inducción de apoptosis por activación de los receptores P2X₇ en otros tipos celulares se decidió explorar este proceso en las células de la teca. Dado que la teca experimenta apoptosis durante el proceso de atresia, la participación del receptor P2X₇ podría tener implicaciones en la regulación de este proceso. En el presente estudio exploramos esta idea utilizando células en cultivo primario, por lo cual consideramos que es un paso inicial en la comprensión de una ruta compleja de señalización en el ovario de mamífero.

HIPÓTESIS

Existen evidencias de la expresión de transcritos de receptores específicos para ATP en las células del folículo ovárico de mamífero, particularmente del receptor P2X₇; proponemos que estas células presentan receptores funcionales que participan en eventos celulares como el aumento en la concentración de Ca⁺⁺ intracelular y la inducción de apoptosis.

OBJETIVOS

General

- Estudiar la expresión y funcionalidad de receptores purinérgicos en las células del folículo ovárico de mamífero.

Particulares

- Estudiar si el ATP induce muerte celular en células del folículo ovárico de mamífero
- Documentar la expresión del receptor P2X₇ en el ovario de ratón
- Documentar la expresión del receptor P2X₇ en el ovario porcino
- Analizar la funcionalidad del receptor P2X₇ en células aisladas de la teca ovárica registrando la movilización de calcio intracelular en respuesta a agonistas específicos
- Establecer la participación del receptor P2X₇ en la inducción de muerte celular apoptótica *in vitro* en células del folículo ovárico de mamífero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Los compuestos ATP, UTP, adenosina (Ado), 2'-3'-O-(4-benzoilbenzoil)adenosina 5'-trifosfato (Bz-ATP), adenosina 5'-trifosfato oxidado a periodato (Ox-ATP), piridoxal fosfato-6-azo (benzeno-2,4-ácido disulfónico) (PPADS), fueron obtenidos de Sigma-Aldrich; los anticuerpos fueron de Chemicon y Alomone; el fluoróforo Fluo-4 fue de Molecular Probes, la transcriptasa reversa, el oligo dT, la *Taq* polimerasa, los oligonucleótidos sintéticos y otros reactivos de biología molecular fueron de Invitrogen, el medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), y la mezcla nutritiva DMEM/ F12 Ham de Sigma.-Aldrich, el medio Leibovitz's (L-15), el suero fetal bovino (SFB), la L-glutamina y el antibiótico-antimicótico fueron de Gibco.

Purificación y cultivo de células de la teca del ovario porcino

Los ovarios de porcino fueron obtenidos en el rastro municipal (Corregidora, Querétaro), colectados en medio L-15 complementado con 10% de suero fetal bovino y antibiótico-antimicótico. Se seleccionaron aquellos ovarios con folículos antrales. Los folículos antrales ≥ 4 mm fueron aislados por disección manual en un microscopio estereoscópico utilizando fórceps finos, una vez obtenidos se les retiró cuidadosamente el tejido intersticial remanente. Los folículos limpios se abrieron y las células de la granulosa fueron removidas totalmente utilizando un gendarme de vidrio. Entonces, la teca interna fue separada manualmente de la teca externa. La teca interna fue incubada en 1 ml de tripsina al

0.025% y DNasa I (5 mg/ml, Sigma) en solución de Hanks pH 7.4 por 30 minutos a 37 °C. Finalizada la incubación, la preparación fue agitada vigorosamente, sedimentada por 5 minutos y se desechó el sobrenadante. El botón contenía la teca interna libre de células de la granulosa. Estas células fueron dispersadas enzimáticamente en 1 ml de colagenasa tipo II (1 mg/ml, Sigma) y DNasa I (5 mg/ml) en solución de Hanks pH 7.4 (30 minutos a 37°C). Posteriormente, las células fueron homogenizadas pasándolas 50 veces por una pipeta Pasteur, centrifugadas 5 minutos a 150 RPM y el sobrenadante fue reemplazado por 1 ml de medio de cultivo (DMEM/HAM-F12 1:1 complementado con 1% de suero fetal bovino y antibiótico-antimicótico). El botón celular fue resuspendido y las células fueron sembradas en cajas petri de 3 cm de diámetro a un volumen final de 1.5 ml. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en incubadora con una atmósfera humidificada y 5% de CO₂. El número de células viables obtenidas por este método, cuantificadas por exclusión de azul de tripano, fue >95%.

Inmunohistoquímica e inmunocitoquímica

Folículos antrales (>4 mm) de porcino, fueron fijados en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS pH 7.4 por 4 horas a temperatura ambiente e incubados 18 horas en sacarosa 30% en PBS pH 7.4. Posteriormente, fueron incluidos en *Jun tissue freezing solution* (Leica), congelados a -20°C y cortados en un crióstato (Leica CM1850) a un grosor de 10 µM. Las rebanadas se recolectaron en portaobjetos gelatinizados. Para la inmunodetección los cortes fueron descongelados y fijados nuevamente en PFA al 4% en PBS y posteriormente lavados con PBS. Los cortes fueron bloqueados con suero de cabra al 4% en PBS, lavados e incubados toda la noche con el anticuerpo primario policlonal conejo anti ratón P2X₇

(dilución 1:200) en solución bloqueadora. Después fueron lavados con PBS e incubados por una hora a 37°C en el segundo anticuerpo anti IgG de conejo acoplado a rodamina (dilución 1:200), al final de esta incubación las muestras fueron lavadas, montadas en DABCO y analizadas en un microscopio de fluorescencia (Nikon).

Para inmunocitoquímica las células fueron cultivadas en cubreobjetos previamente tratados con poli-D-Lisina. Los cultivos semiconfluentes (~90%) fueron fijados en 4% PFA por 25 minutos, lavadas con PBS y bloqueadas con suero de cabra al 4% en PBS. Para la inmunodetección se procedió de manera similar que con los cortes de tejido.

Movilización de Ca⁺⁺ intracelular

Células de la teca del ovario porcino fueron cultivadas en cubreobjetos previamente tratados con poli-D-Lisina. Cultivos semiconfluentes (90%) fueron cargados con 5 µM de Fluo-4 AM (Molecular Probes) y 0.1% de ácido plurónico en solución Krebs/Ringer (NaCl 150 mM, KCl 1 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1.5 mM, glucosa 4 mM, HEPES 10 mM y BSA 0.05 % pH 7.4) por 30 minutos. Posteriormente fueron lavadas 20 minutos en la misma solución y colocadas en una cámara de registro con flujo constante adaptada a un microscopio de fluorescencia invertido (Olympus) acoplado a una cámara fotográfica *Evolution QEi* (Media cybernetics). Los cambios en la concentración de Ca⁺⁺ intracelular [Ca⁺⁺]_i fueron registrados por fotografías cada 250 mS, como se ha descrito previamente (Mason et al., 1993). El análisis de las imágenes se realizó en el software *Image-Pro Plus* software (Media cybernetics).

Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa

RNA total del ovario murino, porcino o de células de la teca de cerdo en cultivo fue purificado por el método de isotiocianato de guanidina (Chomezynski y Sacchi, 1997). Se sintetizó la primer cadena del DNA complementario (cDNA) utilizando transcriptasa reversa, 1 µg de RNA pretratado con DNasa I, oligo dT y oligonucleótidos hexaméricos al azar como cebadores, en un volumen total de 50 µl. El DNA sintetizado se utilizó como templado en reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los pares de oligonucleótidos y las temperaturas de alineación de la reacción de PCR fueron los siguientes (en todos los protocolos se utilizó para desnaturalización del DNA 94°C por 50 segundos y para síntesis 72°C por 50 segundos):

Para la subunidad del receptor P2X₇ de ratón el oligonucleótido sentido fue 5' CATATGACAAGACAAGGAAGAC 3' y el antisentido 5' GGTTGCAATCCCAGTAGATCTC 3', alineación 55°C por 40 segundos. Para la enzima “*steroidogenic acute regulatory protein*” (Star) de cerdo, el oligonucleótido sentido fue 5' AAC CAG GAG GGC TGG AAG AAG 3' y el antisentido 5' GCA GCC AGG TGA GTT TGG T 3', alineación 55 °C por 40 segundos. Para la subunidad del receptor P2X₇ de cerdo se utilizaron oligonucleótidos diseñados contra las secuencias alineadas de toro (*Bos taurus*) y rata (*Rattus norvegicus*) (Ramírez y Kunze, 2002) el oligonucleótido sentido fue 5' AAG AGC CTG TCA TCA GTT CTG TGC AC 3' y el antisentido 5' AGA TCT CAA TGC CCA TGA TTC CTC CC 3', para esta amplificación se utilizaron 60°C por 60 seg. en el paso de *annealing*. Las reacciones de PCR fueron analizadas por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, los amplificados del tamaño esperado fueron purificados por extracción alcalina con fenol/cloroformo (pH 8) y subclonados en el vector pGEM-T

(Promega). Los insertos fueron secuenciados utilizando oligonucleótidos M13Forward y M13Reverse y la secuencias fueron analizadas en el programa público BLAST (NIH, USA).

Western blot

Los extractos de ovario y cerebro se obtuvieron utilizando un politrón en la solución de homogenización (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, MgCl₂ 3 mM, EDTA 20 mM, NaCl 100 mM e inhibidores de proteasas *mini-complete* de Roche). Los homogenados fueron centrifugados a 10000 x g por 10 minutos, el sobrenadante fue recuperado y se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford. Un volumen equivalente a 50 µg de proteína de cada homogenado fueron mezclados con 1 volumen de amortiguador de Laemlli, hervidos 5 minutos, centrifugados a 5000 xg por 5 minutos y fraccionados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa por electrotransferencia semiseca (Biorad). Las membranas fueron bloqueadas por 2 horas a temperatura ambiente en solución TBS-T (Tris 20 mM pH 7.4, Tween 20 0.05%) con 5% de leche descremada, lavadas con TBS-T e incubadas toda la noche a 4°C con el primer anticuerpo (conejo anti ratón P2X₇ en dilución 1:1000, Chemicon) en solución bloqueadora. Posteriormente, las membranas fueron lavadas e incubadas 2 horas a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo (cabra anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa, en dilución 1:5000) en solución bloqueadora. Finalmente las proteínas reactivas se visualizaron por adición del sustrato diaminobenzidina.

Ensayo de fragmentación del DNA

Después del protocolo de estimulación señalado en cada experimento, las células fueron lavadas con PBS e incubadas en 300 µl de solución de lisis fría (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100® y SDS) por 30 minutos a 4°C. Los lisados celulares fueron recolectados y tratados con RNasa A (1 mg/ml) por 1 hora a 37 °C y posteriormente con proteinasa K (0.2 mg/ml) por 40 minutos a 37 °C. A continuación el DNA se purificó por extracción con fenol/cloroformo pH 8, para esto se adicionaron 500 µl de la mezcla de solventes, las muestras se agitaron vigorosamente durante 15 segundos y se centrifugaron 10 minutos a 14000 RPM, la fase acuosa fue recuperada y el DNA fue precipitado por adición de 2 volúmenes de etanol absoluto. El DNA fue visualizado por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%.

TUNEL

La fragmentación del DNA *in situ* fue visualizada por el marcaje de los extremos 3' cohesivos (con un grupo –OH libre) utilizando la reacción de la deoxinucleotidil transferasa (TUNEL), utilizando un kit comercial (*Death-End* Promega), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En resumen, las células adheridas a cubreobjetos previamente tratados con poli-D-Lisina y estimuladas de acuerdo al protocolo de cada experimento, fueron lavadas con PBS y fijadas en paraformaldehído al 4% por 25 minutos, permeabilizadas en tritón X-100 al 1% por 30 minutos e incubadas en peróxido de hidrógeno al 0.01% para bloquear la actividad de peroxidasas endógenas. Posteriormente fueron lavadas con PBS e incubadas con la mezcla de reacción que contenía la enzima y nucleótidos biotinilados por una hora a

37 °C en cámara húmeda. A continuación, las preparaciones fueron enjuagadas e incubadas en estreptavidina conjugada a peroxidasa. Finalmente las muestras se lavaron y el revelado de la reacción se realizó por la adición del sustrato diaminobenzidina, el análisis del marcaje se realizó por microscopía de luz.

Ensayo de unión de anexina V-Cy3

Este ensayo fue realizado con anexina V conjugada a Cy3 (Sigma) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En resumen, las células de la teca fueron cultivadas en cubre objetos tratados con poly-D-lisina. y estimuladas de acuerdo al protocolo de cada experimento. Al tiempo indicado, las células se lavaron una vez con PBS y tres veces con solución de unión (HEPES 10 mM pH 7.5, NaCl 140 mM y CaCl₂ 2.5 mM). Posteriormente se incubaron en la oscuridad con el conjugado anexina V-Cy3 por 10 minutos a temperatura ambiente y fueron lavadas cinco veces con la misma solución. El marcaje fue visualizado en un microscopio de fluorescencia.

RESULTADOS

Apoptosis mediada por estimulación purinérgica.

La apoptosis es un proceso de gran importancia en la fisiología ovárica, que ocurre de manera constante en varios procesos. Por ejemplo, en la selección folicular, siendo el mecanismo por el cual se elimina a aquellos folículos que no llegan a ovular. Así como en la ovulación, pues la liberación del ovocito involucra muerte apoptótica de las células de la pared de folículo. En la literatura existen reportes que vinculan la activación de receptores P2 con la inducción de muerte celular apoptótica (Rassendren et al., 1997; Ferrari et al., 1999), en las células ováricas este sistema ha sido pobremente estudiado y particularmente en las células de la teca ovárica no había sido descrito.

Apoptosis en células de la granulosa

Para realizar estos experimentos se cultivaron células de la granulosa de ratón, los cultivos semiconfluentes fueron incubados 10 horas en MEM α 0.5% de suero fetal, pues las células de la granulosa no sobreviven en ausencia de suero. Posteriormente las células fueron estimuladas con 100 μ M, 500 μ M, 1 mM ó 5 mM de ATP por 24 horas, ninguno de estos estímulos produce muerte celular, el análisis del DNA genómico de estas células no mostró fragmentación.

Apoptosis en células de la teca

En estudios anteriores de otros grupos de trabajo se había reportado que los ovarios no expresaban receptores P2 (Bardini et al., 2000), sin embargo, estudios realizados por nuestro laboratorio han descrito varios receptores de la familia P2 en los diferentes tipos celulares del ovario (Garay y Arellano, 2001). Previamente, utilizando técnicas de inmunohistoquímica en rebanadas del ovario de ratón se detectó la expresión de los subtipos P2X₄ y P2X₇ en las células de la teca. Debido a que existían reportes de inducción de apoptosis por activación de los receptores P2X₇ en otros tipos celulares se decidió utilizar en experimentos iniciales el estímulo con ATP y además el agonista Bz-ATP, que es altamente selectivo de los receptores P2X₇ (González et al., 1989).

Los cultivos primarios de células de la teca de ratón utilizados en estos ensayos fueron cultivados con 1% de suero fetal por 12 horas y posteriormente incubados en medio sin suero por 2 horas; el estímulo con 1 mM y 5 mM de ATP ó 250 μ M y 750 μ M de BzATP por 24 horas produce fragmentación internucleosomal del DNA genómico y cambios en la morfología celular asociados a muerte celular (Figura 3). El estímulo con 100 ó 500 μ M de ATP no induce el efecto. Como control positivo se utilizó taspigargina 10 nM, un bloqueador de la ATPasa de Ca⁺⁺ del retículo sarcoplásmico, la inducción de apoptosis por esta droga ha sido ampliamente demostrada (McConkey et al., 1996).

A

PM Control TG Bz Bz ATP ATP
 10 nM 250 750 1 mM 5 mM
 μ M μ M

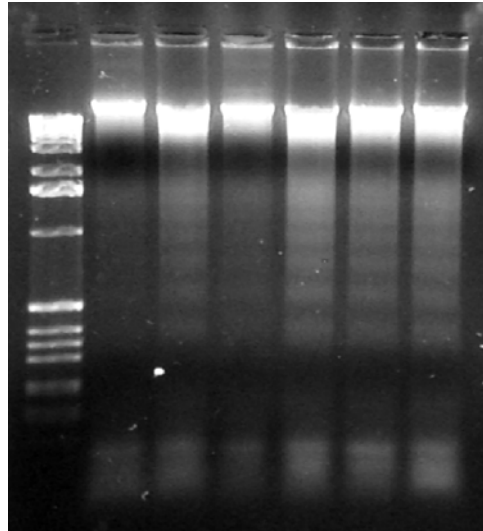
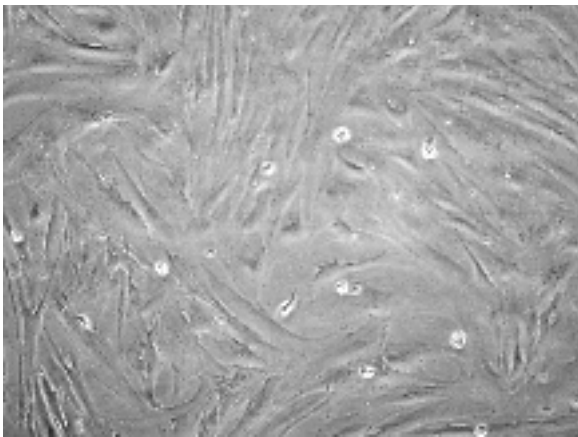
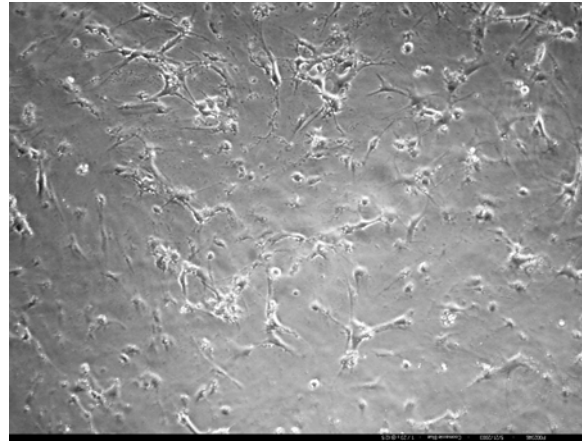
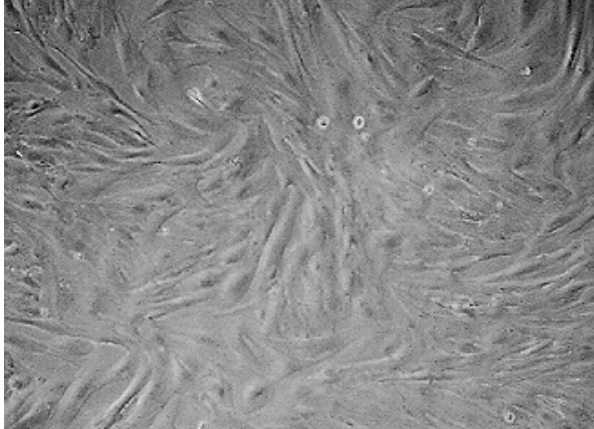
**B****C**

Figura 3. A) Efecto de tapsigargina (TG), ATP y Bz-ATP sobre la fragmentación del DNA genómico de células de la teca de porcino y sobre la morfología de células de la teca de porcino B) Células control y C) estimuladas con ATP 1 mM.

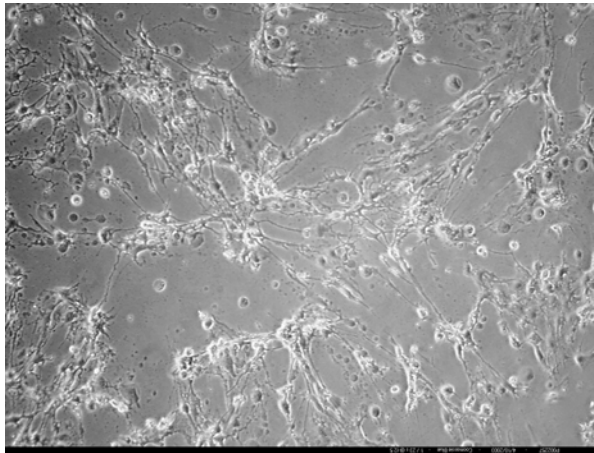
Con el fin de demostrar que la muerte celular se induce por la interacción de ATP con sus receptores específicos realizamos el experimento preincubando las células con suramina (100 μ M), un antagonista no selectivo de los receptores P2 (Figura 4).

A



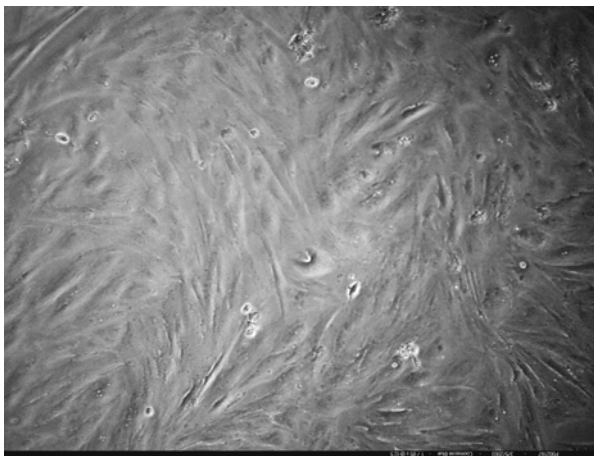
Control

B



ATP 1 mM

C



Suramina 100 μM + ATP 1 mM

Figura 4. Imágenes de contraste de fases de células A) control, B) ATP 1 mM C) Suramina 100 μM + ATP 1mM .

Estas observaciones abrieron la posibilidad de que la inducción de muerte fuese un efecto específico del ATP al actuar sobre sus receptores en las células de la teca. Además permitieron relacionar la inducción de muerte celular con la expresión del receptor P2X₇ en células de la teca; sin embargo, debido a que los datos precisos sobre la expresión del receptor eran insuficientes realizamos la caracterización de la expresión y experimentos *in vitro* donde probamos su funcionalidad con estudios de movilización de calcio intracelular así como su capacidad para inducir apoptosis.

Expresión del receptor P2X₇ en el ovario de ratón:

Para investigar la expresión de este receptor en el ovario de ratón se analizaron homogenados de ovario por western blot utilizando un anticuerpo dirigido contra un péptido correspondiente al carboxilo terminal (aminoácidos 576 a 595) de la subunidad P2X₇ de rata (Chemicon). Las secuencias de ratón y rata presentan 90 % de similitud en este fragmento. Como tejido control se utilizó cerebro de rata y de ratón, en donde se ha demostrado que el receptor se expresa abundantemente (Ralevic y Burnstock, 1998) . La concentración de proteínas totales en cada extracto fue determinada por el método de Bradford y en cada carril se cargaron 50 µg de proteína total.

En el ensayo se logró discernir una banda inmunoreactiva principal (Figura 5A) de aproximadamente 70 kDa, esta banda muestra dos componentes posiblemente como consecuencia de modificaciones postraduccionales de la misma proteína, como el grado de fosforilación o glicosilación, la diferencia en la movilidad electroforética entre ambas bandas es muy discreta. La inmunoreactividad se detecta en cerebro y en ovario. Para confirmar la expresión del receptor en ovario de ratón, se realizó la amplificación de un

fragmento del transcrito del receptor por RT-PCR. Con este fin se obtuvo RNA total del ovario completo, de la teca folicular fresca y de células de la teca cultivadas. Se sintetizó el DNA complementario (cDNA), el cual se utilizó como templado en reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos específicos contra este receptor. En ovario completo, teca fresca y teca cultivada se observó la amplificación de un fragmento de 324 pares de bases que comprende de la base 472 a la 792 de la secuencia del cDNA reportada por Chessell et al., 1998 (Figura 5B). Para corroborar la identidad del amplicon este fue purificado y clonado directamente en el vector pGEMT (Promega) y secuenciado. La secuencia obtenida fue 100% similar a la secuencia reportada (Chessell et al., 1998; NCBI #NM011027).

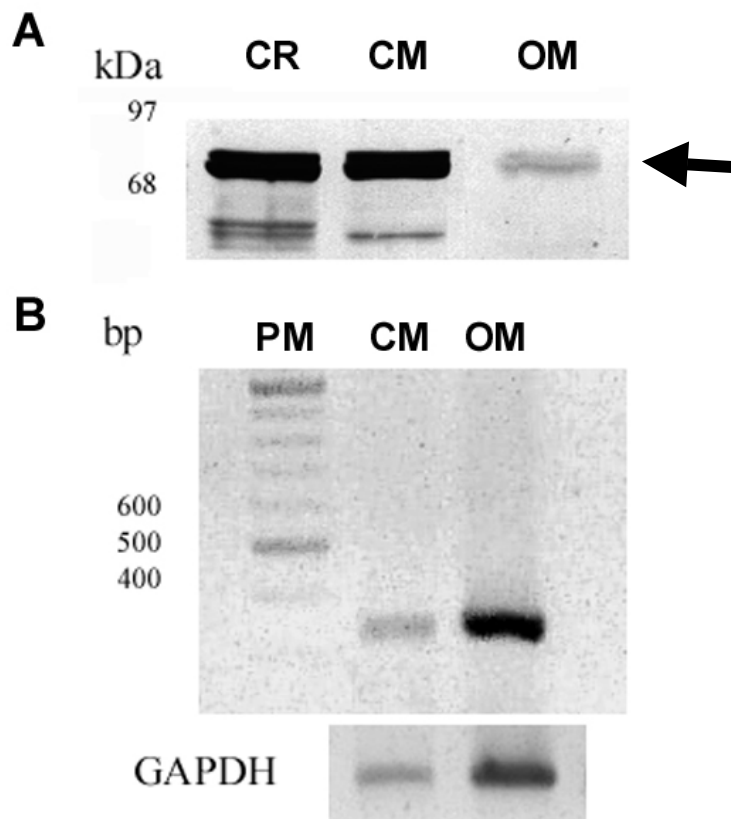


Figura 5. A. Detección de la subunidad el receptor P2X₇ por Western blot en cerebro de rata (CR), cerebro de ratón (CM) y ovario de ratón (OM). B. Amplificación de un fragmento del transcrito del receptor P2X₇ con oligonucleótidos específicos en cDNAs sintetizados a partir de RNA total. PM, marcador de peso molecular.

Distribución del receptor P2X₇

El análisis de la expresión de esta proteína por western blot durante el ciclo estral en el ovario de ratona mostró que la banda es más abundante en el día del estro (Figura 6). La etapa del ciclo estral fue determinada por la realización de frotis vaginal. De acuerdo con estos resultados y para estudiar la localización del receptor se utilizaron ratonas en el día del estro. La detección se realizó por inmunohistoquímica en rebanadas de tejido ovárico.

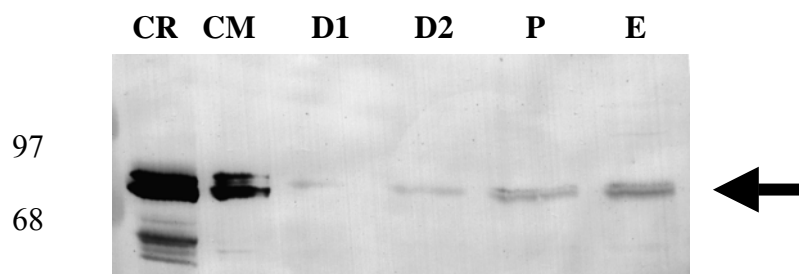


Figura 6. Detección de la subunidad del receptor P2X₇ en homogenados de ovario completo de ratonas cada día del ciclo estral (CR, cerebro de rata; CM, cerebro de ratón. Homogenados de ovario : D1, diestro 1; D2, diestro 2; P, proestro y E, estro).

Como se había mostrado con anterioridad en nuestro laboratorio el estudio de la distribución del receptor P2X₇ por inmunofluorescencia en rebanadas de ovario de ratón reveló que esta proteína se localiza principalmente en la teca de folículos secundarios y antrales y en el epitelio ovárico periférico en el día del estro vaginal. Para confirmar esta observación se realizaron dobles marcajes por inmunofluorescencia del receptor y la enzima citocromo P450 *side chain cleavage* (Figura 7), una enzima de la esteroidogénesis

que se expresa específicamente en las células de la teca (Isobe et al., 2003). En estos estudios pudo detectarse la colocalización de ambas proteínas y por tanto se confirmó la expresión del receptor P2X₇ en la teca del folículo.

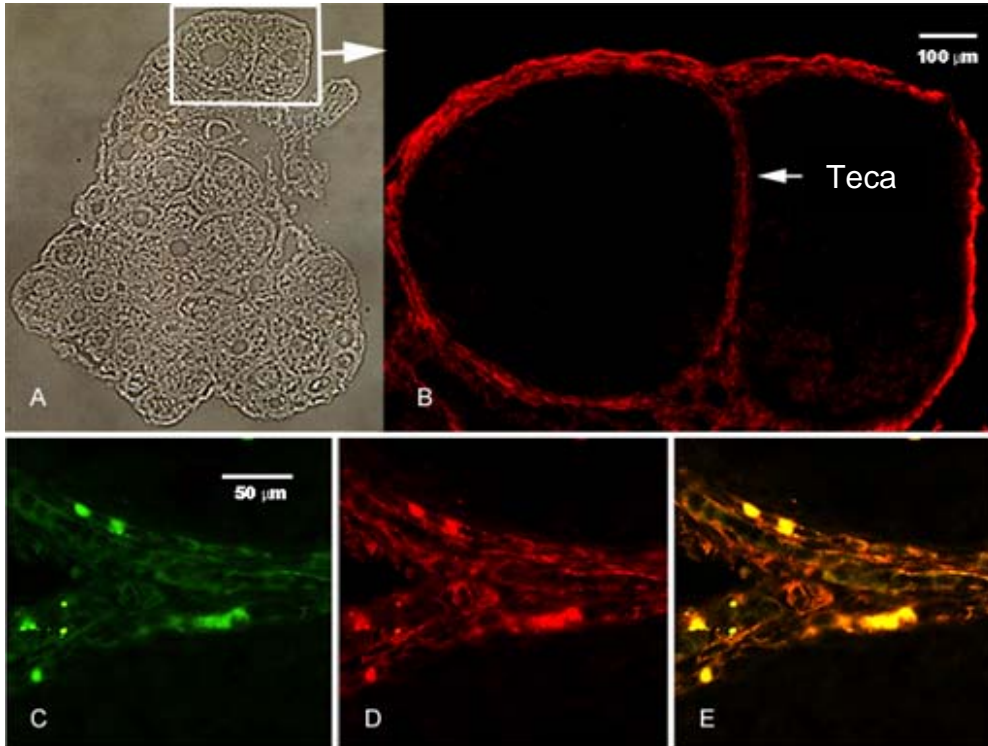


Figura 7. Distribución del receptor P2X₇ en el ovario de ratón por inmunofluorescencia. A) Imagen en contraste de fases de un corte sagital de ovario de ratón. B) Detección de la subunidad del receptor. C) Localización del marcador de teca ovárica citocromo P450 *side chain cleavage*. D) Receptor P2X₇, E) imágenes superpuestas.

Estudios en células aisladas en el modelo del ovario porcino

Los datos de localización del receptor indican que este se expresa de manera consistente y específica en las células de la teca ovárica de folículos secundarios y antrales en ratones en el día del estro. Con el fin de estudiar la importancia fisiológica del receptor en células aisladas se utilizó el ovario porcino debido a que en este modelo es posible diseccionar con facilidad la teca folicular y se obtiene un número suficiente de células para el cultivo primario. Una premisa importante del estudio fue realizar los experimentos en cultivos sin pases de resiembra con el fin de obtener resultados con mayor aproximación a la fisiología, el ovario de ratón no resulta idóneo para este fin debido a su pequeño tamaño.

Como se detalla en la sección de materiales y métodos se utilizaron aquellos ovarios que mostraran folículos mayores de 4 mm y que no mostraran signos de ovulación tales como restos hemáticos. La teca se disecó bajo el estereoscopio y se disgregó por digestión enzimática con colagenasa. Las células obtenidas tuvieron una viabilidad de 96% examinada por la técnica de azul de tripano, y fueron analizadas para comprobar la expresión de marcadores de este tipo celular, así, por RT-PCR se amplificó a la enzima *steroidogenic acute regulatory protein (Star)*, que cataliza la translocación de colesterol hacia la matriz mitocondrial y constituye un paso regulatorio en la esteroidogénesis (Figura 8). Estos primeros pasos enzimáticos en la conversión de colesterol a andrógenos son una función específica de las células de la teca ovárica. El amplicon puede detectarse del mismo modo en cDNAs sintetizados a partir de RNA de teca fresca. Otro marcador de este tipo celular que se detectó es la enzima citocromo P450 *side chain cleavage*, la detección se realizó por inmunofluorescencia >90 % de las células en los cultivos fueron positivas al marcaje.

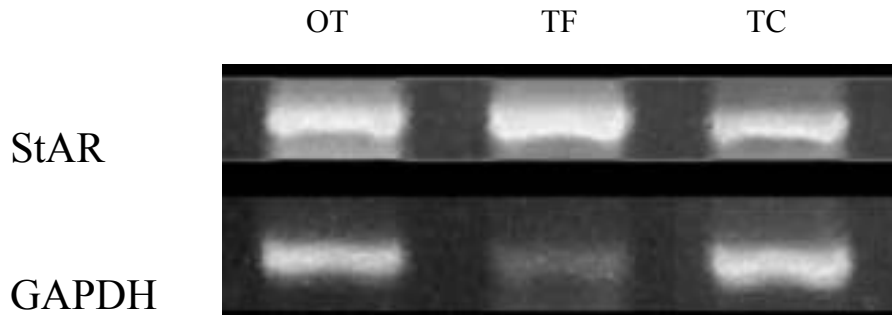


Figura 8. Amplificación del transcrito de StAR, una enzima típica de células de la teca en cDNAs de ovario total (OT), teca fresca (TF) y células de la teca cultivadas (TC). Como transcrito constitutivo se amplificó la enzima gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Por medio de técnicas de inmunofluorescencia fue posible detectar la presencia de receptores P2X₇ en rebanadas de folículos antrales y en monocapas de células de la teca en cultivo (Figura 9). En las rebanadas la señal fue detectada en células de la teca folicular, lo cual pudo determinarse al teñir los mismos cortes con hematoxilina eosina (Figura 9 A y B) la vasculatura presente en la teca es un rasgo definitivo que permite la identificación morfológica de esta capa de células. Por otro lado se realizó la inmunodetección del receptor en cultivos en monocapa de células de la teca de porcino y se obtuvo una marca consistente en la membrana y en el núcleo (Figura 9C); esta observación aunque resulta sorprendente en primera instancia, es consistente con reportes previos en otros tipos celulares como células de músculo liso y células endoteliales (Menzies et al, 2003; Ramirez y Kunze, 2002). El análisis por Western blot de homogenados de cultivos primarios de teca confirma la presencia de la subunidad del receptor P2X₇ (Figura 9D). En estos ensayos se detectaron dos bandas inmunoreactivas, una de ~70 kDa que corresponde con el peso molecular del receptor y otra de ~ 200 kDa que puede corresponder a agregados con el propio receptor o con otras proteínas.

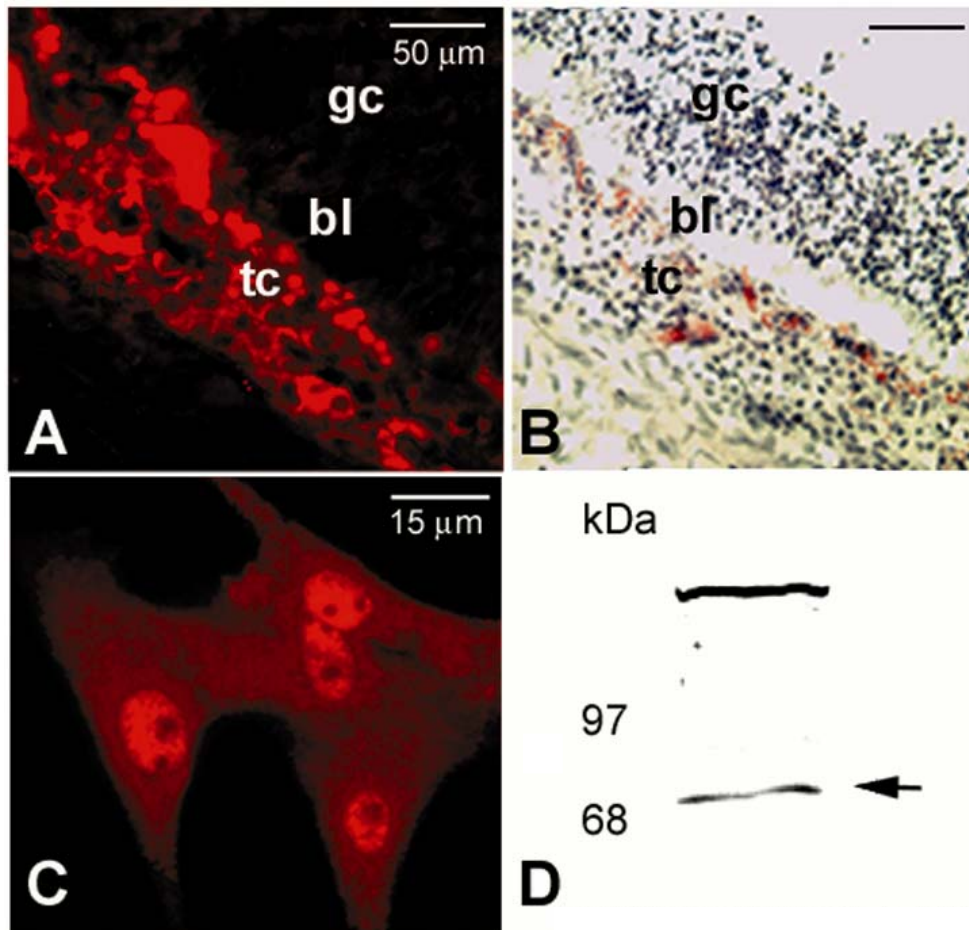


Figura 9. Inmunodetección del receptor P2X₇ en folículos de porcino. A) Los receptores P2X₇ fueron localizados en rebanadas de folículos empleando un anticuerpo contra el receptor de rata y un anticuerpo secundario acoplado a rodamina. B) Tinción con hematoxilina-eosina de la misma rebanada mostrada en A, se observa la localización de las células de la granulosa (gc), la lámina basal (bl) y las células de la teca (tc) en la estructura del folículo. C) Células de la teca de porcino cultivadas marcadas por el mismo procedimiento de inmunodetección del receptor P2X₇. D) Detección por western blot del receptor P2X₇ en homogenados de células de la teca de porcino cultivadas.

Aunque la detección del receptor por medio de anticuerpos era acorde con lo observado en células de ratón no podía afirmarse sin ambigüedad que el receptor P2X₇ es expresado por células de la teca, la confirmación de estos datos requería de la identificación molecular del receptor. Dado que el cDNA de este receptor en porcino no había sido clonado, se utilizaron oligonucleótidos diseñados contra las secuencia alineadas del receptor de toro y rata para amplificar por PCR un fragmento de 610 bp, utilizando como templado cDNA sintetizado a partir de RNA total de teca fresca de folículos antrales de porcino.

La secuencia del amplicon obtenido fue analizada en el programa BLAST del NCBI y alineada con las secuencias existentes utilizando el algoritmo de Clustal Wallis (<http://www.ebi.ac.uk/cgi.bin>). Ambos análisis confirman la identidad del amplificado y puedo concluirse que se trata de la secuencia del receptor. El porcentaje de similitud obtenido fue del 91% con humano y 79 % con rata o ratón (números de acceso NCBI: NM002562, NM019256 y NM011027 respectivamente) (Tabla 3, Figura 10).

Secuencia 1	Secuencia 2	% de similitud
Cerdo	Humano	91
Cerdo	Ratón	79
Cerdo	Rata	79
Humano	Ratón	80
Humano	Rata	48
Ratón	Rata	87

Tabla 3. Porcentaje de similitud entre secuencias del receptor P2X₇ de cerdo, ratón rata y humano obtenidas con el algoritmo de Clustal Wallis.

Tomando como referencia el cDNA del homólogo en humano, esta secuencia de nucleótidos está en su totalidad dentro de la región codificante, de la base 258 a la 866 (610 bp). La secuencia de nucleótidos obtenida ya fue enviada al banco de datos del NCBI y tiene en número de acceso AY894135, recientemente otro grupo clonó un fragmento del mismo receptor en cDNA de cerebro (número de acceso NCBI: AY691687) y la región traslapada entre ambas secuencias es idéntica.

A partir de fragmento amplificado es posible analizar la secuencia de aminoácidos y sugerir si corresponde a un receptor P2X. Al traducir la secuencia clonada se obtienen 202 aminoácidos que representan el 34% del total (595 aa). Si se toma como referencia la secuencia de humano (clave EMBL UniProt Q99572) abarca del E55 a la I257, de acuerdo a la predicción de la estructura, el fragmento completo se localiza en la región del asa extracelular de la subunidad del receptor. El análisis de las secuencias de aminoácidos de la subfamilia de receptores P2X ha mostrado que existen 10 cisteínas conservadas en las 7 subunidades conocidas, que se localizan en la región del asa extracelular y estarían formando enlaces disulfuro de gran importancia para la estructura tridimensional del receptor (North, 2002), estos aminoácidos son considerados una marca de identidad en esta subfamilia de proteínas (Figura 11).

El fragmento obtenido abarcaría 8 de estas cisteínas conservadas, el alineamiento de las secuencias de receptores P2X₇ de rata, ratón y humano con el de porcino muestra que el fragmento presenta las 8 cisteínas esperadas (Figura 12). De acuerdo a North 2002, en esta región hay 40 aminoácidos conservados en total (Figura 11), nuestro fragmento presenta 39 de estos aminoácidos (Figura 12). De esta forma el análisis de la secuencia de aminoácidos permite afirmar que el fragmento clonado corresponde a la subunidad P2X₇.

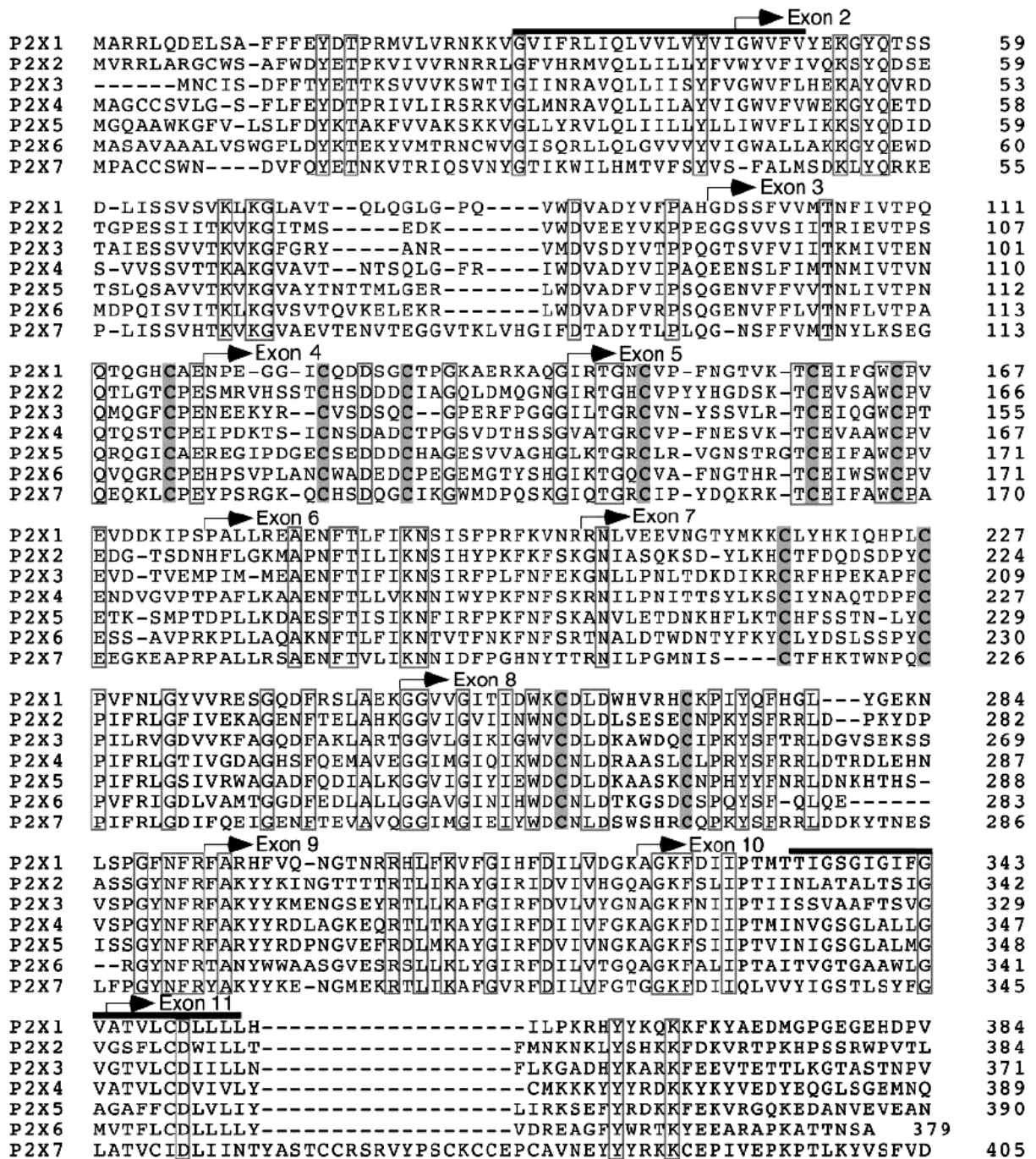


Figura 11. Alineamiento de las 7 subunidades P2X de rata conocidas. En rectángulos sombreados están las cisteínas conservadas, en rectángulos claros los otros aminoácidos conservados, las líneas negras muestran los dominios transmembranales y se señala el inicio de los exones (tomado de North, 2002).

El ATP induce incremento en la concentración de Ca^{++} intracelular en células de la teca de porcino.

Los resultados mostrados hasta este punto del estudio muestran la presencia de receptores P2X_7 en las células de la teca de mamífero. Con el fin de aportar evidencias funcionales de la presencia de estos receptores, se estudiaron cambios en la concentración de Ca^{++} intracelular $[\text{Ca}^{++}]_i$ inducidos por agonistas purinérgicos (Figura 13). Las células de la teca se cargaron con $5 \mu\text{M}$ de fluo-4 AM y se colocaron en una cámara de registro con flujo constante de solución de Krebs, en un microscopio de fluorescencia invertido. Las células fueron estimuladas con las drogas indicadas y los datos fueron colectados por un sistema de fotografía de alta velocidad acoplado a una computadora. Una secuencia de imágenes típica registrada en respuesta al estímulo de 1 mM de ATP se muestra en la Figura 13A, en este caso se registraron imágenes cada 250 ms .

El máximo incremento en fluorescencia fue inducido por 1 mM de ATP $100 \pm 11.2\%$ ($n=47$ células de tres cultivos independientes), UTP 1 mM indujo un incremento de $55 \pm 7.8\%$ ($n=22$ de tres cultivos) y BzATP $250 \mu\text{M}$ produjo un aumento de $47 \pm 4.7\%$ (24 células de tres cultivos) (Figura 13B).

Aunque UTP y BzATP indujeron aumentos similares mostraron diferencias muy importantes en la región subcelular que sufre el aumento de fluorescencia; para documentar este hecho se realizó un análisis en células individuales del aumento de la fluorescencia a lo largo de una línea arbitraria trazada a través de cada célula incluyendo la región del núcleo. UTP induce un aumento en la región perinuclear, mientras BzATP lo hace en toda la célula (Figura 13C), estos resultados son acordes con los mecanismos de transducción esperados

para receptores metabotrópicos (activados por UTP) y para receptores-canal (sensibles a BzATP). La respuesta inducida por ATP fue mayor en amplitud y en ambas regiones subcelulares (Figura 13C).

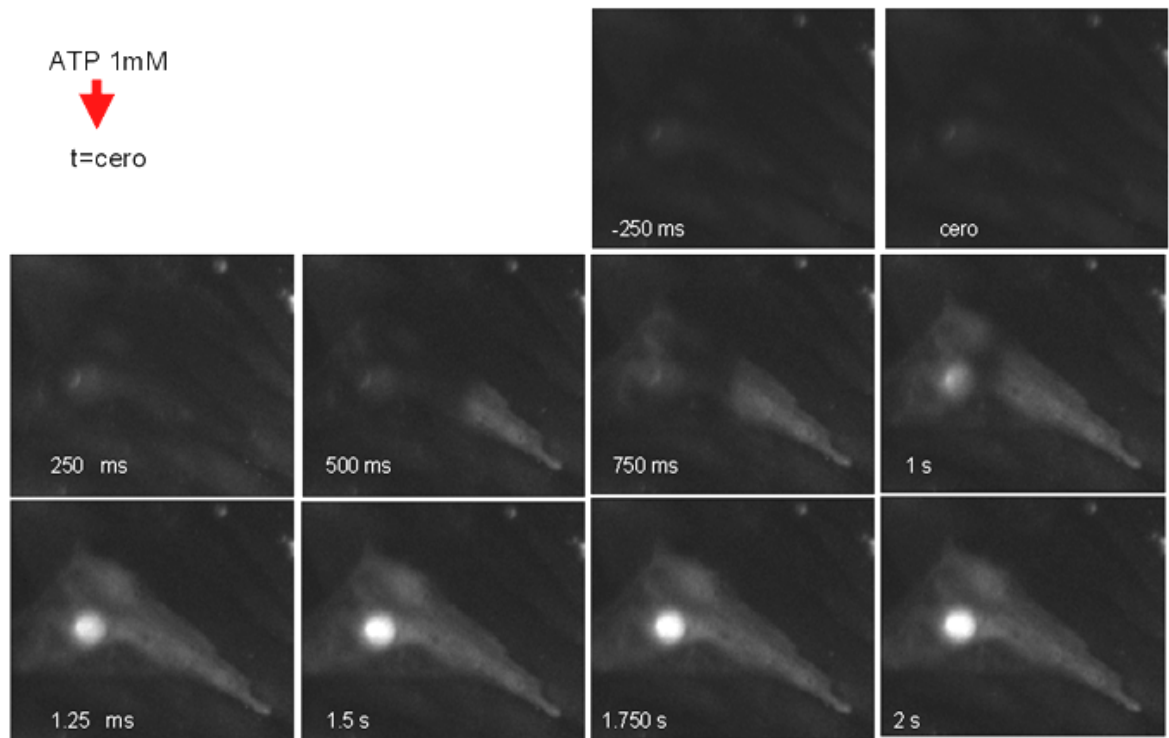
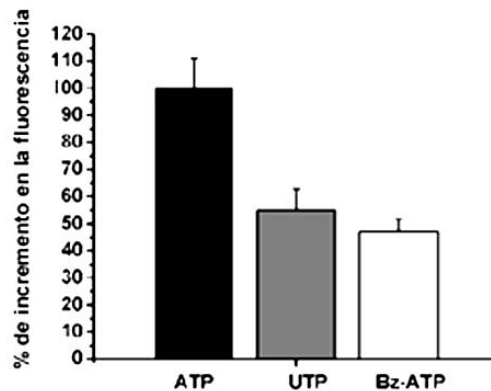
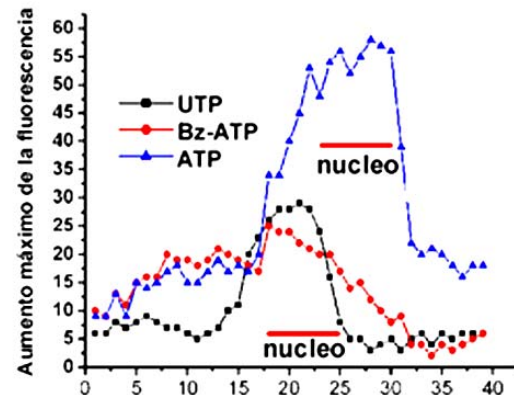
A**B****C**

Figura 13. Agonistas purinérgicos inducen un incremento en $[Ca^{++}]_i$ en células de la teca. Los cultivos celulares se cargaron con fluo-4/AM, y los cambios en la $[Ca^{++}]_i$ se registraron en un microscopio de fluorescencia. A) Una serie típica de imágenes donde se muestra la respuesta a ATP 1 mM con registros cada 250 ms. B) El gráfico muestra la media (\pm S.E.M.) del máximo incremento de la fluorescencia en respuesta a 1 mM de ATP, 1mM de UTP, ó 250 μ M de Bz-ATP (aplicaciones de 20 s). C) UTP y Bz-ATP incrementan la $[Ca^{++}]_i$ en una magnitud similar, sin embargo el patrón espacial es diferente. Esto se muestra en una análisis en células individuales en el que la intensidad de la fluorescencia fue medida a lo largo de una línea arbitraria que cruza la célula pasando por el núcleo.

El ATP extracelular induce muerte celular apoptótica en células de la teca en cultivo.

Como se mostró en los datos iniciales el ATP es capaz de inducir muerte en células de la teca de porcino, para confirmar que se trata de muerte apoptótica se purificó DNA genómico, se realizó el marcaje de TUNEL para la respuesta a ATP y la respuesta inducida por BzATP se estudió con marcaje de unión de anexina V. En todos los experimentos las células se obtuvieron por digestión enzimática de la teca y se cultivaron por 24 h en DMEM-F12 con 1% de suero fetal bovino, antes de los experimentos se ayunaron con DMEM sin suero por 2 horas. El ayuno hasta por 24 horas no induce muerte celular en estos cultivos.

El estímulo con 500 μ M de ATP no tuvo efecto, 1 mM y 5 mM por 24 horas indujeron la muerte del 98% de las células en 10 de 11 cultivos, lo cual se determinó por el ensayo de exclusión de azul de tripano. Las células muertas mostraron características de apoptosis como condensación de la cromatina, estrechamiento del citoplasma, vesiculación de la membrana y formación de cuerpos apoptóticos (Figura 14A versus 14B y 14D versus 14E). En estos cultivos se analizó la fragmentación del DNA genómico, una característica específica de la muerte celular apoptótica. La ruta mitocondrial y la dependiente de ligando de activación de la apoptosis involucran la activación de la DNasa dependiente de caspasas, lo cual produce digestión internucleosomal del DNA y un patrón característico de escalera cuando el DNA purificado se analiza por electroforesis (Hsueh et al., 1994). Este patrón típico de escalera se observó en 6 de 11 ensayos (Figura 14C). Como control positivo de los experimentos se estimularon algunos cultivos con taspigargina 10 nM, un inhibidor de la Ca^{++} -ATPasa del retículo endoplásmico, esta droga ha sido utilizada para inducir apoptosis

porque la acumulación de ión calcio en el citoplasma como resultado de la inhibición de la ATPasa activa al apoptosoma (McConkey et al., 1996). Las células de la teca sufren muerte celular en presencia de taspigargina y el DNA muestra un patrón de escalera característico (Figura 14C).

Para cuestionar si el efecto era inducido por un metabolito del ATP se probó adenosina 1 mM, la presencia de este nucleósido por 24 h no indujo muerte celular o fragmentación de DNA (Figura 14C). Para confirmar estas observaciones se utilizó la técnica de TUNEL en cultivos estimulados con ATP con el fin de marcar cuerpos de DNA. Estas preparaciones mostraron características propias de apoptosis como vesicularización de la membrana plasmática y formación de cuerpos apoptóticos, el marcaje se reprodujo en tres experimentos independientes (Figura 14E-F). Del mismo modo los cambios morfológicos y la marca positiva del ensayo de TUNEL fueron producidos utilizando Bz-ATP 250 mM (Figura 14C y F).

Por otra parte PPADS (300 μ M), un antagonista de los receptores P2X (Lambrecht et al., 1992), bloqueó la muerte celular inducida por ATP y la fragmentación del DNA genómico en 3 de 5 experimentos (Figura 14G-H); concentraciones mayores del antagonista resultaron tóxicas para los cultivos. Así mismo el antagonista de los receptores P2X₇, ATP oxidado a aldehído (Murgia et al., 1993), bloqueó la inducción de muerte celular en 3 experimentos independientes. Estos datos, en suma, sugieren la participación del receptor P2X₇ en la inducción de apoptosis.

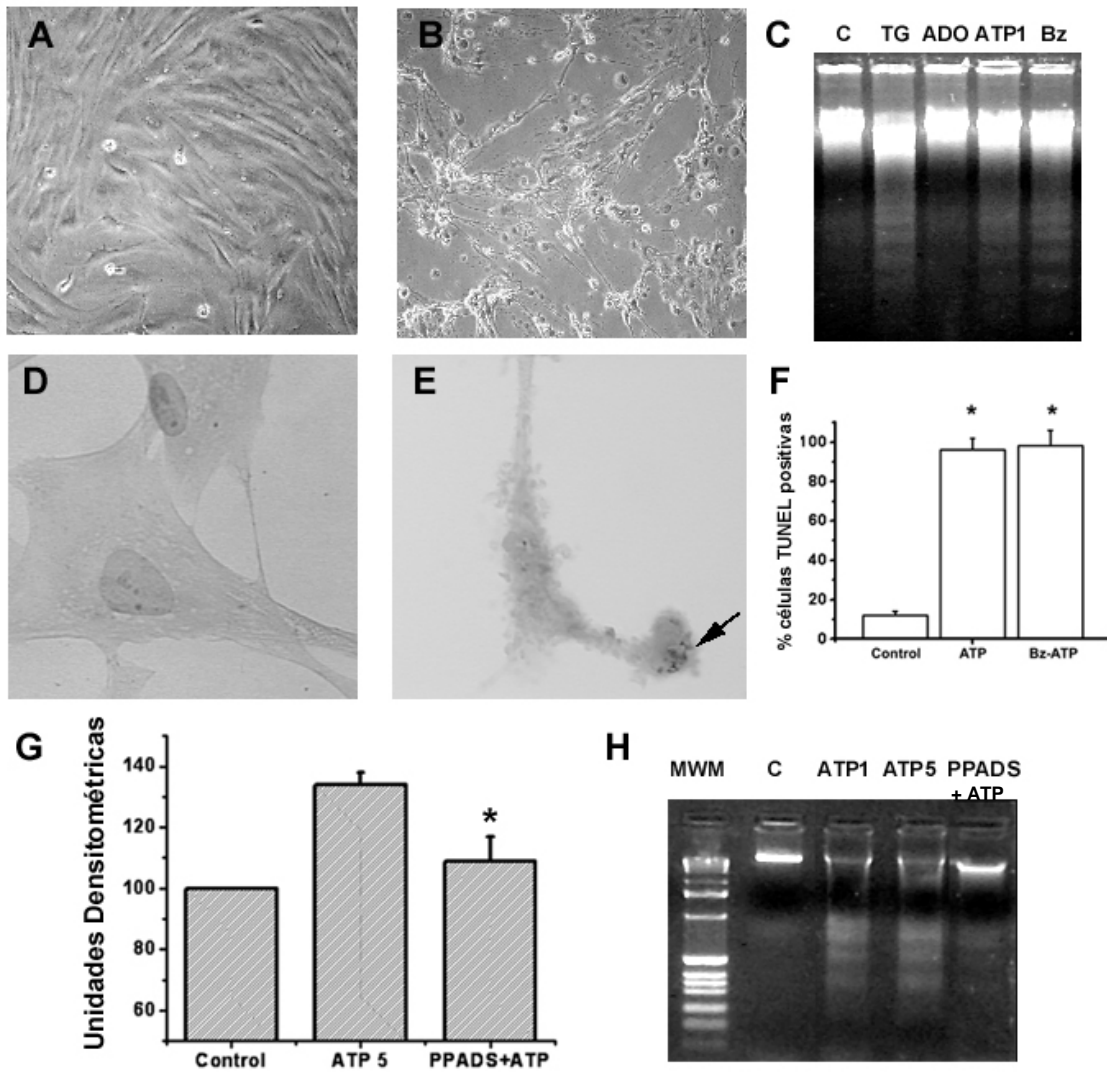


Figura 14. El ATP induce muerte celular apoptótica en células de la teca de porcino cultivadas. Los cultivos celulares fueron incubados en ausencia (A y D) o presencia de 1 mM de ATP (B y E) por 24 h. El estímulo purinérgico indujo muerte celular con características de apoptosis. Las imágenes en A y B fueron obtenidas por microscopía de contraste de fases (20X), mientras que D y E (100X) corresponden a células procesadas para TUNEL (la flecha en E indica el DNA marcado por TUNEL). C) El DNA de las células tratadas con ATP mostró fragmentación internucleosomal al visualizarlo en geles de agarosa al 1.5%. Los carriles corresponden a : C, control; TG, tapsigargina 100 nM como control positivo; ADO, adenosina 1 mM; ATP 1, ATP 1 mM y Bz, Bz-ATP 250 μ M respectivamente. F) El gráfico muestra la media (\pm E.E.M.) de células positivas en el ensayo de TUNEL, como porcentaje del número total de células en campos de tres experimentos independientes en condiciones control o para células incubadas en ATP 1 mM o Bz-ATP 250 μ M, (* p <0.01 vs. control). G-H) La inducción de fragmentación de DNA fue bloqueada por PPADS como se muestra en el análisis densitométrico del DNA de bajo peso en el patrón de escalera y en las imágenes representativas (* p <0.05 vs. ATP).

Para explorar a fondo esta respuesta utilizamos el ensayo de unión de anexina V (Figura 15). Este ensayo detecta la translocación de fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática, una característica temprana de la apoptosis, fenómeno que puede ser cuantificado con mayor detalle. Los cultivos celulares (n=3) fueron estimulados con ATP 1 mM o Bz-ATP 200 μ M por un periodo de dos horas. La detección fue realizada incubando las células estimuladas con anexinaV-Cy3 y visualizadas en un microscopio de fluorescencia, imágenes representativas de esta ensayo se muestran en la Figura 15 A-D.

Un análisis más detallado de la respuesta a Bz-ATP resultó en una estimación de la EC50 de \sim 150 μ M, y el curso temporal para este efecto utilizando 250 μ M de Bz-ATP mostró que el 50% de las células fueron positivas al marcaje con anexina V en \sim 2 h. De manera consistente con los resultados obtenidos con la fragmentación de DNA, el ensayo de anexina V sugiere que la activación del receptor P2X₇ está involucrada en la inducción de muerte celular en células de la teca *in vitro*.

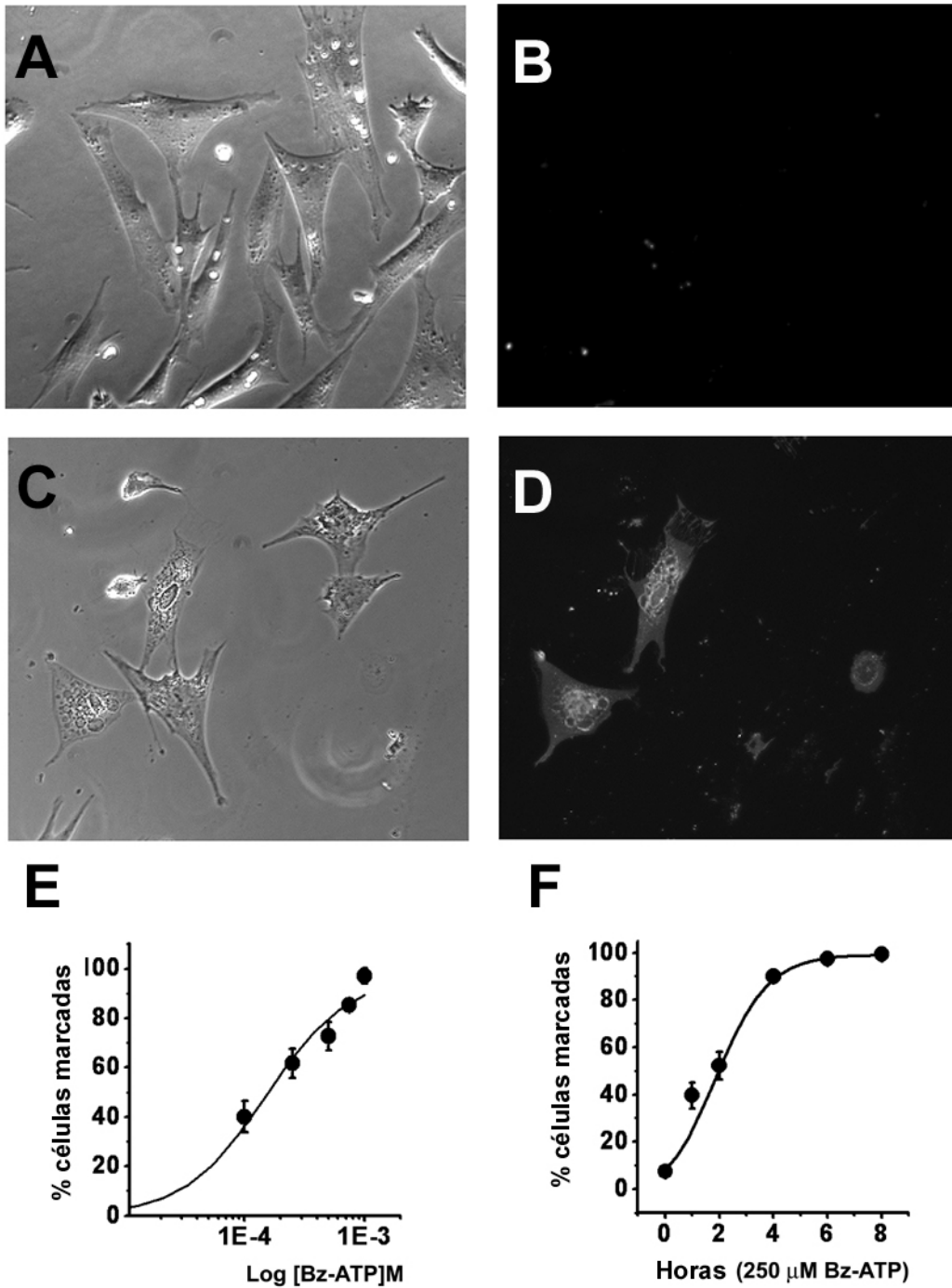


Figura 15. El ensayo de anexina V utilizando un marcador fluorescente (Cy3) unido a esta proteína fue utilizado para caracterizar la inducción de muerte celular por Bz-ATP. En A y C se muestran imágenes de contraste de fases y en B y D imágenes de fluorescencia de células control (A-B) o células tratadas con 250 μ M de Bz-ATP (C-D). En E y F se muestra la curva dosis respuesta y curso temporal (con 250 μ M de Bz-ATP) respectivamente.

La inducción de muerte celular dependiente de ATP extracelular es un evento dependiente de Ca^{++} .

El receptor canal P2X_7 ha sido vinculado con anterioridad a la inducción de apoptosis, se ha propuesto que la apertura de este canal produce una despolarización sostenida de la membrana y un incremento constante en el calcio citosólico, pues no se desensibiliza, que altera la permeabilidad de la membrana por activación de poro de transición mitocondrial. Como consecuencia se altera el potencial de membrana de la mitocondria y se liberan de este organelo factores proapoptóticos como el citocromo C (Kantrow and Piantadosi, 1997), lo cual desencadena la cascada apoptótica. La inducción de apoptosis dependiente del receptor P2X_7 se ha documentado en macrófagos (Ferrari et al., 1997), células dendríticas del sistema inmune (Countinho-Silva et al., 1999) y en las células mesangiales del riñón (Schulze-Lohoff et al., 1998). No obstante recientemente se ha mostrado que la apoptosis promovida por este receptor puede estar regulada por vías independientes de Ca^{++} que involucran la activación de una vía de transducción de la cinasa asociada a RhoA, ROCK1 (Mckenzie et al., 2005).

Con el fin de explorar si el calcio extracelular está involucrado en el efecto que observamos en cultivos de teca reducimos la concentración de Ca^{++} extracelular y posteriormente aplicamos 250 μM de Bz-ATP. La concentración de Ca^{++} extracelular fue disminuida por la adición de EGTA 5 mM al medio, bajo estas condiciones la concentración del ión se reduce a concentraciones menores al rango μM (Yi et al., 2002). Este secuestro del Ca^{++} extracelular resultó deletéreo por sí mismo para las células (4 cultivos independientes) efecto que no fue estudiado a fondo. No obstante cuando además

del EGTA 5mM agregamos 2-5 mm de Mg^{++} las células sobreviven por más de 5 horas. La inducción de muerte celular por el tratamiento con 250 μM de Bz-ATP por 2 horas en células que habían sido incubadas con EGTA y Mg^{++} disminuyó a 32%, mientras que en los cultivos control con medio de cultivo normal el valor es de 55% (Figura 16). Este efecto pudo observarse en cuatro experimentos de diferentes cultivos. Estas observaciones sugieren que la inducción de apoptosis depende del influjo de Ca^{++} .

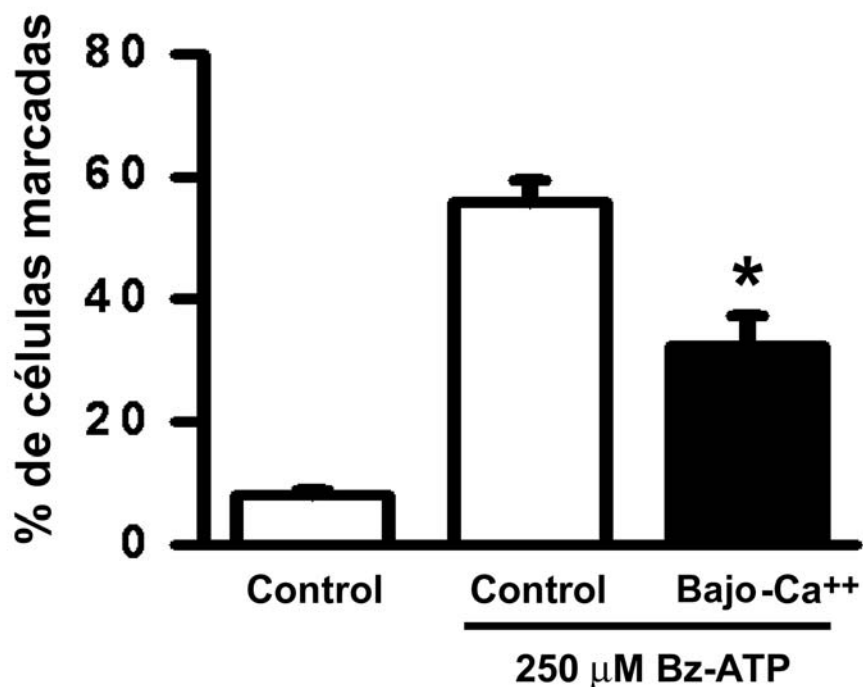


Figura 16. La apoptosis inducida por Bz-ATP depende de la concentración de Ca^{++} extracelular. El gráfico muestra el porcentaje de células que sufren apoptosis con o sin 250 μM de Bz-ATP en medio control (columnas blancas) cuantificadas con el ensayo de unión de anexina V. El número de células apoptóticas por el tratamiento con Bz-ATP se redujo en un medio donde el Ca^{++} fue secuestrado por la adición de 5 mM de EGTA (y 2 mM de Mg^{++} , columna negra). * $p < 0.05$ vs. Control estimulado con Bz-ATP.

Discusión

Estudios pioneros describieron que en el folículo atrésico, las células de la teca sufren hipertrofia y se incorporan al tejido intersticial (Himmelstein-Braw et al., 1976), posteriormente, estudios morfológicos demostraron que las células que rodean al folículo atrésico experimentan picnosis nuclear, una evidencia de la fragmentación del DNA que se presenta de forma característica en la apoptosis (O'Shea et al., 1978). Recientemente se ha demostrado que las células de la teca de los folículos atrésicos de porcino, vaca y rata mueren por apoptosis (Tilly et al., 1992; Palumbo and Yeh, 1994; Isobe and Yoshimura, 2000). Esto implica que la muerte de las células de la teca puede ser importante en la inducción o en la progresión de la atresia folicular. A la fecha se han descrito algunos mensajeros celulares que inducen apoptosis *in vitro* en las células de la teca ovárica tales como TGF- α y TGF- β (Foghi et al., 1998a), hormona luteinizante (Yacobi et al., 2004) y el ligando Fas (Foghi et al., 1998b).

En el presente estudio, demostramos que los receptores P2X₇ se expresan en las células de la teca ovárica de ratón y puerco; en estudios *in vitro* con cultivos primarios de teca de porcino demostramos que estos receptores son funcionales al promover aumento en la $[Ca^{++}]_i$ y que median la acción del ATP como inductor de apoptosis, sugiriendo un papel potencial del sistema purinérgico en la regulación de la fisiología ovárica que involucran muerte celular apoptótica.

La subunidad del receptor P2X₇ de ratón es una proteína con una masa de aproximadamente 68.4 kDa (Chessell et al., 1998). Por western blot detectamos una banda

inmunoreactiva de ~70 kDa en homogenados de ovario, esta banda es similar a lo observado en homogenados de cerebro que se emplearon como control positivo. Este resultado es acorde a estudios previos realizados en diferentes tejidos (Ramírez and Kunze, 2002; Schrier et al., 2002). Otros grupos de investigación han analizado la distribución de receptores P2 en el tracto reproductivo y el ovario de la rata utilizando inmunohistoquímica, en estos trabajos han descrito la presencia del receptor P2X₇ en el epitelio vaginal y en las células endometriales pero no en el ovario (Bardini, et al.). Estos datos controversiales impusieron la necesidad de un análisis más a fondo de la expresión de estos receptores en el ovario de ratón. En el presente trabajo se demostró la presencia del transcrito de P2X₇ en RNA total del ovario de ratón por trascrición reversa y PCR (RT-PCR), así como el patrón de expresión de la proteína en rebanadas de ovario por inmunofluorescencia. Estos resultados mostraron claramente que el receptor se expresa en las células de la teca folicular, lo cual fue corroborado por la realización de dobles marcajes con la enzima citocromo P450 *side chain cleavage*, una proteína que es considerada un marcador de teca ovárica.

Del mismo modo, en el presente estudio demostramos la expresión del receptor P2X₇ en las células de la teca del ovario porcino, en preparaciones *in situ*, así como en cultivos primarios. Estas observaciones fueron complementadas por Western blot en homogenados de teca fresca proveniente de folículos antrales. Aunque el cDNA completo del receptor P2X₇ de porcino aún no ha sido clonado, amplificamos un fragmento del transcrito a partir de RNA total de células de la teca recién aislada por RT-PCR, el fragmento clonado corresponde al 34% del transcrito y mostró un porcentaje de similitud del 91% con el transcrito de humano, esta secuencia ya ha sido enviada a la base de datos del NCBI y tiene el número de acceso AY894135. Recientemente otro grupo ha reportado

otro fragmento del cDNA del receptor clonado de tejido neural (NCBI #AY691687), dicha secuencia es idéntica a la obtenida en este estudio en la región en que se traslapan. El análisis de la secuencia de aminoácidos que se obtuvo al traducir el fragmento clonado mostró que se trata de 202 aminoácidos que estarían ubicados en el segmento transmembranal, presenta 8 cisteínas conservadas en los 7 miembros de la subfamilia, y 39 aminoácidos conservados, el 100% de los esperados. La secuencia primaria corresponde a un miembro de la subfamilia P2X. Estas evidencias soportan la idea de que las células de la teca de porcino expresan al receptor canal P2X₇ y pueden utilizarse como modelo para estudiar su papel en la fisiología ovárica.

La funcionalidad del receptor fue monitoreada midiendo el aumento en la concentración de Ca⁺⁺ intracelular ([Ca⁺⁺]_i) en respuesta a agonistas purinérgicos en células de la teca cultivadas. La [Ca⁺⁺]_i se incrementó cuando las células fueron estimuladas con ATP o Bz-ATP. Aunque ambos agonistas evocan incrementos en [Ca⁺⁺]_i difieren claramente en potencia, siendo el ATP el más efectivo. Este hecho sugiere que la teca expresa receptores P2 insensibles a Bz-ATP. Entre varias drogas purinérgicas probadas, UTP, y Bz-ATP incrementaron la [Ca⁺⁺]_i en una magnitud similar indicando que receptores P2 acoplados a proteínas G, sensibles a UTP (P2Y) están presentes en las células de la teca. Bz-ATP evocó un incremento generalizado en la [Ca⁺⁺]_i, mientras que el aumento promovido por UTP ocurre principalmente en la región perinuclear. Esto es consistente con el mecanismo demostrado para receptores P2X₇ y P2Y activados por UTP en distintos sistemas celulares (Ralevic and Burnstock, 1988). En resumen, los resultados demuestran que los receptores P2X₇ expresados en la membrana de células de la teca son funcionales, y que el aumento en la [Ca⁺⁺]_i inducida por ATP es aditiva e involucra al menos dos subtipos de receptores.

El receptor P2X₇ se ha asociado a apoptosis en varios tipos celulares (Ferrari et al., 1997; Ferrari et al., 1999; Humphreys et al., 2000; Countinho-Silva et al., 1999; Schulze-Lohoff et al., 1998). En el presente estudio se mostró por purificación de DNA genómico, TUNEL y unión de anexina V que el ATP induce apoptosis en células de la teca en cultivo y los datos farmacológicos indican firmemente que esta acción es mediada por la activación de receptores P2X₇. Algunos cultivos que presentaron muerte celular no mostraban fragmentación del DNA genómico, lo que sugiere que el ATP puede inducir necrosis celular, un efecto que ha sido bien documentado en macrófagos (Ferrari et al., 1999). No obstante, cuando la inducción de apoptosis por ATP o Bz-ATP fue evaluada con el ensayo de unión de anexina V, todos los cultivos probados (n=8) mostraron marcaje positivo.

Se ha propuesto que la activación de receptores P2X₇ produce una elevación en la concentración de Ca⁺⁺ en el citoplasma que trae como consecuencia la activación de proteínas proapoptóticas (Ferrari et al., 1999; Countinho-Silva et al., 1999). En este estudio mostramos que la activación de los receptores P2X₇ en células de la teca por Bz-ATP produce un incremento en la [Ca⁺⁺]_i y también que el secuestro del calcio extracelular con EGTA reduce el número de células positivas para la unión de anexina V, lo cual sugiere que el influjo de Ca⁺⁺ es necesario para que se presente la respuesta apoptótica. Sin embargo la quelación del Ca⁺⁺ no inhibe completamente el proceso apoptótico, esto puede tener varias causales. Por ejemplo, que exista Ca⁺⁺ residual en el medio no obstante la adición de 5 mM de EGTA, o que el receptor active una vía apoptótica independiente de Ca⁺⁺ lo cual ya ha sido propuesto recientemente (Mackenzie et al., 2005).

Proponemos que en el contexto de la fisiología ovárica, la activación del receptor P2X₇ puede funcionar como un integrador de la información del sistema nervioso periférico. Está bien establecido que el ATP participa como un neuroefector simpático,

actuando como cotransmisor con norepinefrina (NE) (Burnstock, 1999). Se ha demostrado que el ovario está innervado por componentes del sistema nervioso simpático. Esta innervación está en contacto con las células de la teca, sin embargo no cruza la lámina basal del folículo ovárico (Burden, 1985; Lara et al., 2002). En este mismo orden de ideas, en experimentos *in vivo* se ha mostrado que la información periférica es relevante en la fisiología ovárica; por ejemplo, la desnervación farmacológica en la rata prepuberal induce cambios en la distribución de la población folicular (Lara et al., 1990). Una explicación estimable para estas observaciones sería que la regulación de la atresia folicular estuviera alterada. Aunque estos trabajos se han centrado en la señalización catecolaminérgica, nuestros resultados abren la posibilidad de que el sistema purinérgico participe en la regulación de este tipo de eventos. La liberación de ATP de las terminales nerviosas puede activar receptores P2X₇ en las células de la teca de folículos antrales y desencadenar apoptosis o necrosis y finalmente atresia folicular. Aproximaciones experimentales en modelos fisiológicos son necesarios para establecer el posible papel del sistema descrito .

Otra posibilidad no excluyente de la anterior es que el ATP en el ovario funciona como un modulador parácrino-autócrino. El ATP es un transmisor celular comúnmente parácrino-autócrino. Efectos diversos del ATP se han estudiado en plaquetas, leucocitos, células endoteliales, células de músculo liso, osteoblastos, células β -pancreáticas, células de Sertoli y condrocitos y ellos pueden ser estimulados por una amplia gama de agentes o condiciones como hipoxia, acidosis, deformación mecánica, choque osmótico, estimulación de receptores y estimulación mecánica (Revisado en Bodin and Burnstock; 2001). Recientemente se ha demostrado que en folículos de la rana *Xenopus* existe un sistema purinérgico en el que la teca desempeña un papel modulador central, y la fuente principal

de ATP en este sistema parece ser el propio ovocito (Maroto and Hamill, 2001; Saldaña et al., 2005). Como se ha mostrado en otras especies, el ATP puede ser liberado por distintos componentes intrafoliculares ejerciendo efectos parácrinos-autócrinos, incluida la inducción de apoptosis.

En resumen, los resultados descritos en el presente trabajo son el primer reporte de la expresión y función de receptores purinérgicos en la células de la teca. Se ha establecido *in situ* que el receptor P2X₇ se expresa de manera específica en este tipo celular y en experimentos *in vitro* que el canal es funcional, pues es capaz de inducir cambios en la concentración de Ca⁺⁺ intracelular y muerte celular apoptótica. La participación del sistema purinérgico en la fisiología ovárica ha sido pobremente investigada, y nuestros datos abren la posibilidad de conocer nuevos elementos que regulan de la función ovárica. Dado que nuestros datos funcionales son en modelos *in vitro*, estudios en el animal completo permitirán establecer las implicaciones fisiológicas de esta expresión.

Referencias

- Adams JM, Cory S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281:1322-1326.
- Amenta F, Cavalotti C. 1980. Immunohistochemical demonstration of a myosin-like protein in the oocyte. *Acta Histochem Cytochem* 13:619-622.
- Arellano RO, Martínez-Torres A. and Garay E. 2002. Ionic currents activated via purinergic receptors in the cumulus cell-enclosed mouse oocyte. *Biol Reprod* 67 :837-846.
- Armstrong D.G. and Webb R. 1997. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Rev Reprod* 2 :139-146.
- Bardini M, Lee HY, Burnstock G. 2000. Distribution of P2X receptor subtypes in the female reproductive tract at late pro-oestrous/early oestrous. *Cell Tissue Res* 299: 105-113.
- Bedell MA, Brannan CI, Evans EP, Copeland NG, Jenkins NA, Donovan PJ. 1995. DNA rearrangements located over 100 kb 5' of Steel (Sl)-coding region in *Steel-panda* and *Steel-contrasted* mice deregulate Sl expression and cause female sterility by disrupting ovarian follicle development. *Genes & Develop* 9 :455-470.
- Bernardi P, Colonna R, constantini P, Ericksson O, Fontaine E, Ichas F, Massari S, Nicolli A, Petronilli V, Scorrano L. 1998. The mitochondrial permeability transition. *Biofactors* 8:273-281.
- Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. 1998. Calcium: a life and death signal. *Nature* 395:645-648.

- Bertrand G, Chapal J, Loubatières-Mariani MM, Roye M 1987. Evidence for two different P₂-purinoceptors on beta cell and pancreatic vascular bed. *Br J Pharmacol* 91:783-787.
- Bian X, Hughes FM Jr, Huang Y, Cidlowski JA, Putney JW jr. 1997. Roles of cytoplasmic Ca²⁺ and intracellular Ca²⁺ stores in induction and suppression of apoptosis in S49 cells. *Am J Physiol* 272:C1241-1249.
- Bjersing L. 1978. Maturation, morphology and endocrine function of the follicular wall in mammals. In Jones RE, editor. The mammalian ovary. Comparative Biology. New York: Raven Press. pp 181-214.
- Bodin P, Burnstock G. 2001. Purinergic signaling: ATP release. *Neurochem Res* 26: 959-969.
- Boyer JL, Lazarowski ER, Chen X-H, Harden TK. 1993. Identification of a P_{2Y}-purinergic receptor that inhibits adenylyl cyclase. *J Pharmacol Exp Ther* 267: 1140-1146.
- Brake AJ, Wagenbach MJ, Julius D. 1994. New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 371:519-523.
- Braw RH, Tsafriiri A. 1980. Effect of PMSG on follicular atresia in the rat ovary. *J Reprod Fert* 59: 267-272.
- Brock JA, Cunnane TC. 1999. Effects of Ca²⁺ concentration and Ca²⁺ channel blockers on noradrenaline release and purinergic neuroeffector transmission in rat tail artery. *Br J Pharmacol* 126:11-12.
- Burden HW. 1985. The adrenergic innervation of mammalian ovaries. In: Ben-Jonathan N, Bahr JM, Weener R, editors. Catecholamines as hormone regulators. New York: Raven Press. pp 261-278.
- Burnstock G. 1999. Purinergic cotransmission. *Brain Res Bull* 50: 355-357.

- Burnstock G, Warland JJ. 1987. P₂-purinoceptors of two subtypes in the rabbit mesenteric artery: Reactive blue 2 selectively inhibits responses mediated via the P_{2Y}- but not the P_{2X}-purinoceptor. *Br J Pharmacol* 90:383-391.
- Chang K, Hanaoka K, Kumada M, Takuwa Y. 1995. Molecular cloning and functional analysis of a novel P₂ nucleotide receptor. *J Biol Chem (Tokio)* 270:26152-26158.
- Chessell IP, Simon J, Hibell AD, Michel AD, Barnard EA, Humphrey PP. 1998. Cloning and functional characterization of the mouse P_{2X7} receptor. *FEBS Letters* 439: 26-30.
- Chomezynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Ann Biochem* 162:156-159.
- Countinho-Silva R, Persechini PM, Da Cunha R, Perfettini JL, Torres AC, Kanellopoulos JM, Motta-Ly I, Dautry-Varsat A, Ojcius DM. 1999. P_{2Z}/P_{2X7} receptor dependent apoptosis of dendritic cells. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 276: C1139-C1147.
- Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early folliculogenesis. *Nature* 383 :531-535.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102:33-42.
- Dunaif AE, Zimmerman EA, Friesen HG, Frantz AG. 1982. Intracellular localization of prolactin receptor and prolactin in the rat ovary by immunohistochemistry. *Endocrinology* 110:1465-1473.

- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annual Review Biochemistry* 68:383-424.
- Eramaa M, Hilden K, Tuuri T, Ritvos O. 1995. Regulation of inhibin/activin subunit messenger ribonucleic acids (mRNAs) by activin A and expression of activin receptor mRNAs in cultured human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 136 :4382-4389.
- Erb L, Garrad R, wang Y, Quinn T, Turner JT, Weisman GA. 1995 Site-directed mutagenesis of P_{2U} purinoceptors. Positively charged amino acids in transmembrane helices 6 and 7 affect agonist potency and specificity. *J Biol chem* 270:4185-4188.
- Ferrari D, Chiozzi P, Flazoni S, Susino MD, Melchiorri L, Baricordi OR, Di Virgilio F. 1997. Extracellular ATP triggers IL-1 β release by activating the purinergic P2Z receptors of human macrophages. *J Immunol* 159: 1451-1458.
- Ferrari D, Los M, Bauer MKA, Vandenabeele P, Wesselborg S, Schultze-Osthoff K. 1999. P2Z purinoceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. *FEBS letters* 447:71-75.
- Foghi A, Ravandi A, Teerds KJ, Van Der Donke H, Ksis A, Dorrington J. 1998a. Fas ligand apoptosis in rat theca/interstitial cells through sphingomyelin-ceramide pathway. *Endocrinology* 139:2041-2047.
- Foghi A, Teerds KJ, Van Der Donke H, Moore NC, Dorrington J. 1998b. Induction of apoptosis in theca/interstitial cells: action of transforming growth factor (TGF) alpha plus TGF beta on Bcl-2 and interleukin-1 beta converting enzyme. *J Endocrinol* 157: 489-494.

- Freeman ME. 1994. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: The Physiology of Reproduction. Editores : Knobil E. & Neil J.D. Raven Press New York USA.
- Frindlay JK, Drummond AE, Dyson ML, Baillie AJ, Robertson DM, Ethier F. 2002. Recruitment and development of the follicle ; the roles of the transforming growth factor- β superfamily. *Mol Cell Endocrinol* 191: 35-43.
- Garay E, Arellano RO. 2001. Transmission of purinergic-evoked electrical signals from cumulus cells to the oocyte in the mouse. *Biol Reprod* 64 (suppl 1):152-153 (abstract 118).
- Gonzalez FA, Ahmed AH, Lustig KD, Erb L, Weisman GA. 1989. Permeabilization of transformed mouse fibroblast by 3'-O-(4-benzoyl adenosine 5'-triphosphate and the desensitization of the process. *J Cell Physiol* 139:109-115.
- Gordon JL (1986) Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J* 233:309-319.
- Greenwald GS, Roy SK. 1994. Follicular development and its control. In: Knobil E, Neill JD, editors. The physiology of reproduction Vol 2.. New York: Raven Press. pp 629-724.
- Guo Q, Christakos S, Robinson N, Mattson MP. 1998. Calbindin D28K blocks the proapoptotic actions of mutant presenilin I: reduced oxidative stress and preserved mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3227-3232.
- Guthrie HD, Garret WM, Cooper BS. 1998. Follicles stimulating hormone and insulin growth factor I attenuate apoptosis in cultured porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 58: 390-396.

- Himmelstein-Braw R, Byskov AG, Peters H, Faver M. 1976. Follicular atresia in the infant human ovary. *J Reprod Fertil* 46: 55-59.
- Hsueh AJ, Billing H, Tsafiriri A. 1994. Ovarian follicle atresia: A hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Rev* 15(6):707-724.
- Hsueh AJW, Erickson GF, Papkoff H. 1983. Effects of diverse mammalian gonadotropins on estrogen and progesterone production by cultured rat granulosa cells. *Arch Biochem Biophys* 225:505-511.
- Hsueh AJW, Jones PBC, Adashi EY, Wang C, Zhuang LZ, Welsh TR. 1983. Intraovarian mechanisms in the hormonal control of granulosa cell differentiation in rats. *J Reprod Fertil* 69:325-342.
- Huang EJ, Manova K, Packer AI, Sanchez S, Bachvarova RF, Besmer P. 1993. The murine *steel panda* mutation affects kit ligand expression and growth of early ovarian follicles. *Developmental Biol* 157 :100-109.
- Ichas F, Mazat JP. 1998. From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochem Biophys Acta* 1366:33-50.
- Ikeuchi Y, Nishizaki T. 1996. The P2Y purinoceptor operated potassium channel is possibly regulated by the $\beta\gamma$ subunits of a pertussis-toxin-insensitive G-protein in cultured rat inferior colliculus neurons. *Biochem Biophys Res Comm* 214:589-596.
- Isobe N, Nakao T, Yoshimura Y. 2003. Distribution of cytochrome P450-side chain cleavage in the theca internal layers of bovine small antral and cystic follicles. *Reprod Domestic Anim* 38:405-409.

- Isobe N, Yoshimura Y. 2000. Localization of apoptotic cells in the cystic ovarian follicles of cows: a DNA-end labeling histochemical study. *Theriogenology* 53:897-904.
- Kamada S, Blackmore PF, Oehninger S, Gordon K, Hogden GD. 1994. Existence of P₂-purinoceptors on human and porcine granulosa cells. *J Clin Endocrin Metab* 78 :650-656.
- Kantrow SP, Piantadosi CA. 1997. Release of cytochrome *c* from liver mitochondria during permeability transition. *Biochem Biophys Res Comm* 232: 669-671.
- Kason BG, Meidan R, Davoren TB, Hsueh AJW. 1985. Identification of sub-population of rat granulosa cells: sedimentation properties and hormonal responsiveness. *Endocrinology* 117:1024-1034.
- Kennedy C, Burnstock G. 1985. Evidence for two types of P₂-purinoceptor in the longitudinal muscle of the rabbit portal vein. *Eur J Pharmacol* 111:49-56.
- Keppens S, De Wulf H. 1991. Characterization of the biological effects of 2-methylthio-ATP on rat hepatocytes: Clear-cut differences with ATP. *Br J Pharmacol* 1004:301-304.
- Kim TH, Zhao Y, Barber MJ, Kuharsky DK, Yin XM. 2000. Bid-induced cytochrome *c* release is mediated by a pathway independent of mitochondrial transition pore and Bax. *J Biol Chem* 275:39474-39481.
- Lambrecht G, Friebe T, Grimm U, windscheif U, Bungardt E, Hildebrandt C, Bäumert HG, Spatz-Kümbel G, Mutschler E. 1992. PPADS, a novel functionally selective antagonist of P₂ purinoceptor-mediated responses. *Eur J Pharmacol* 217:217-219.
- Lara HE, Dorfman M, Venegas M, Luza SM, Luna SL, Mayerhofer A, Guimaraes MA, Rosa E Silva AAM, Ramírez VD. 2002. Changes in sympathetic nerve activity of

- the mammalian ovary during a normal estrous cycle and in polycystic ovary syndrome: Studies on norepinephrine release. *Microscop Res Tec* 59:495-502.
- Lara HE, McDonald JK, Ahmed CE, Ojeda SR. 1990. Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and function in rats. *Endocrinology* 127:2199-2209.
- Lawrence IE Jr, Burden HW. 1980. The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the ovary. *Anatomic Record* 196:51-59.
- Le KT, Babinski K, Seguela P. 1998. Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heterotrimeric ATP receptor. *J Neuroscience* 18:7152-7159.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiate an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489.
- Mackenzie AB, Young MT, Adinolfi E, Surprenant A. 2005. Pseudoapoptosis induced by brief activation of ATP-gated P2X7 receptors. *J Biol Chem.* 280(40):33968-33976.
- Malam-Souley R, Seye C, Gadeau AP, loirand G Pillois X, Cmpan M, Pacaud P, Desgranges C (1996) Nucleotide receptor P_{2U} partially mediates ATP-induced cell cycle progression of aortic smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 166:57-65.
- Mason WT, Hoyland J, Davison I, Carew MA, Jonassen J, Zorec R, Lledo PM, Shankar G, Horton M.. 1993. Technology for real time fluorescent ratio imaging in living cells using fluorescent probes for ions. In: *Molecular Imaging in Neuroscience. A Practical Approach*. Edited by Sharif NA. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokio, pp: 171-207.

- Maroto 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.
- McConkey DJ, Greene G, Pettaway CA. 1996. Apoptosis resistance increases with metastatic potential in cells of the human LNCaP prostate carcinoma line. *Cancer Res* 15: 5594-5599.
- McGee E.A. and Hsueh A.J. (2000) Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Rev* 21(2) :200-214.
- Menzies J, Andrew P, Kennedy C. 2003. P2X7 subunit-like immunoreactivity in the nucleus of visceral smooth muscle cells of the guinea pig. *Autonom Neuroscience Basic & Clin* 106:103-109.
- Murgia M, Hanau S, Pizzo P, Ripa M, Di Virgilio F. 1993. Oxidized ATP: An irreversible inhibitor of the macrophage purinergic P_{2Z} receptor. *J Biol Chem* 268: 8199-8203.
- Newbolt A, Stoop R, Virginio C, Surprenant A, North RA, Buell G, Rassendren F. 1998. Membrane topology of an ATP-gated ion channel (P2X receptor). *J Biol Chem* 273:15177-15182.
- Nicholson DW, Thornberry NA. 1997. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22:299-306.
- Nishimori K. and Matsuk M.M. 1996. Transgenic mice in the analysis of reproductive development and function. *Rev Reprod* 1, 203-212.
- North A. 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82:1013-1067.
- Ohkubo T, Yamazaki J, Nakasiima Y, Kitamura K. 2000. Presence and possible role of the spliced isoform of the P2X1 receptor in rat vascular smooth muscle cells. *Pflügers Arch* 441: 57-64.

- O'Shea JD, Hay MF, Cran DG. 1978. Ultrastructural changes in the theca interna during follicular atresia in sheep. *J Reprod Fertil* 54 183-187.
- Owens GP, Hahn WE, Cohen JJ. 1991. Identification of mRNAs associated with programmed cell death in immature thymocytes. *Mol Cell Biol* 11:4177-4188.
- Palumbo A, Yeh J. 1994. *In situ* localization of apoptosis in the rat ovary during follicle atresia. *Biol Reprod* 51: 888-895.
- Park H-J., Lee J., Wang L., Park J-H and Kwon H-B. 2000. Stage-specific expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor messenger RNA during ovarian follicle development in the rat. *Endocrinology* 141 :702-709.
- Park O-K and Mayo K. 1991. Transient expression of progesterone receptor messenger RNA in ovarian granulosa cells after the preovulatory luteinizing hormone surge. *Mol Endocrinol* 5 :967-978.
- Parr CE, Sullivan DM, Paradiso AM, Lazarowski ER, Burch LH, Olsen JC, Erb L, Weisman GA, Boucher RC, Turner JT. 1995. Cloning and expression of a human P_{2U} nucleotide receptor, a target for cystic fibrosis pharmacology. *Proc Nat Acad Sci USA* 91:3275-3279.
- Peluso JJ. 1997. Placing progesterone in the apoptotic pathway. *Trends Endocrinol Metab* 8:261-266.
- Pinton P, Ferrari D, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R. 2001. Molecular machinery and signaling events in apoptosis. *Drug Develop Res* 52:558-570.
- Radford KM, Virginio C, Surprenant A, North RA, Kawashima E. 1997. Baculovirus expression provides direct evidence for heteromeric assembly of P2X₂ and P2X₃ receptors. *J Neuroscience* 17:6529-6533.

- Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HF, Ishizaki Y, Jacobson MD (1993) Programmed cell death and the control of cell survival. *Science* 262:695-700.
- Ralevic V, Burnstock G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50(3) :413-492.
- Ramirez AN, Kunze DL. 2002. P2X purinergic receptor channel expression and function in bovine aortic endothelium. *Am J Physiol (Circ Physiol)* 282:H2106-H2116.
- Rassendren F, Buell GN, Virginio C, Collo G, North A, Surprenant A. 1997. The permeabilizing ATP receptor, P2X₇. *J Biol Chem* 272:5482-5486.
- Richards JS. 1979. Hormonal control of ovarian follicular development : a 1978 perspective. *Rec Prog Horm Res* 35 :343-373.
- Richards JS, Russell DL, Ochsner S, Espey LL. 2002. Ovulation : New dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Ann Rev Physiol* 64 :69-92.
- Robker RL, Richards JS. 1998. Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells : a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27KIP1. *Mol Endocrinol* 12 :924-940.
- Saldaña C, Vázquez-Cuevas F, Garay E, Arellano RO. 2005. Ephithelium and/or theca are required for ATP-elicited K⁺ current in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *J Cell Physiol* 202:814-821.
- Schrier SM, Florea BI, Mulder GJ, Nagelkerke JF, Ijzerman AP. 2002. Apoptosis induced by extracellular ATP in the mouse neuroblastoma cell line N1E-115: studies on involvement of P2 receptors and adenosine. *Biochem Pharmacol* 63:1119-1126.
- Schulze-Lohoff E, Hugo C, Rost S, Arnold S, Gruber A, Brüne B, Sterzel R. 1998. Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured cells via P2Z/P2X₇ receptors. *Am J Physiol (Renal Physiol)* 275: F962-F971.

- Sharma SC, Clemens JW, Pisarska MD, Richards JS. 1999. Expression and function of estrogen receptor subtypes in granulosa cells : regulation by estradiol and forskolin. *Endocrinology* 140 :4320-4334.
- Silva JM, Price CA. 2002. Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro. *J Endocrinol* 174 : 499-507
- Simon AM, Goodenough DA, Li E, Paul DL. 1997. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* 385 : 525-529.
- Sirois J. and Richards J.S. (1993)Transcriptional regulation of the rat prostaglandin endoperoxide synthase 2 gene in granulosa cells. *The Journal of Biological Chemistry* 268 : 21931-21938.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Constantini P, Loeffler M, Larochette N, GoodlettDR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441-446.
- Tai CJ, Kang SK, Cheng KW, Choi KC, Nathwani PS, Leung PC. 2000. Expression and regulation of P2U-purinergic receptor in human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 85 :1591-1597.
- Tai CJ, Kang SK, Choi KC, Tzeng CR, Leung PC. 2001a. Antigonadotropic action of adenosine triphosphate in human granulosa-luteal cells : Involvement of protein kinase C α . *J Clin Endocrinol Metab* 86(7) :3237-3242.

- Tai CJ, Kang SK, Choi KC, Tzeng CR, Leung PC. 2001b. Adenosine triphosphate activates mitogen-activated protein kinase in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 142(4):1554-1560.
- Thompson CB. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1455-1462.
- Tilly JL, Kowalski KI, Schomberg D, Hsueh AJW. 1992. Apoptosis in atretic ovarian follicles is associated with selective decreases in messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptors and cytochrome P450 aromatase. *Endocrinology* 131:1670-1676.
- Tokuyama Y, Hara M, Jones EMC, Fan Z, Bell GI. 1995. Cloning of rat and mouse P_{2Y} purinoceptors. *Biochem Biophys Res Comm* 211:211-218.
- Torres GE, Egan TM, Voight MM. 1999. Identification of o domain involved in ATP-gated ionotropic receptor subunit assembly. *J Biol Chem* 274:22359-22365.
- Torres GE, Haines WR, Egan TM, Voigt MM. 1998. Co-expression of P2X₁ and P2X₅ receptor subunits reveals a novel ATP-gated ion channel. *Mol Pharmacol* 54:989-993.
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakuseh M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102:43-53.
- von Kügelgen I, Wetter A. 2000. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362:310-323.
- Wandji SA, Wood TL, Crawford J, Levinson SW, Hammond JM. 1998. Expression of mouse ovarian insulin growth factor system component during follicular development and atresia. *Endocrinology* 139:5205-5214.

- Webb R.J., Bains H., Cruttwell C, Carroll J. 2002. Gap-junctional communication in mouse cumulus-oocyte complexes : implications for the mechanism of meiotic maturation. *Reproduction* 123 : 41-52.
- Webb TE, Boluyt MO, Barnard EA. 1996. Molecular biology of P2Y purinoceptors: Expression in heart. *J Auton Pharmacol* 16:303-307.
- Westfall DP, Todorov LD, Mihaylova-Todorova ST. 2002. ATP as a cotransmitter in sympathetic nerves and its inactivation by releasable enzymes. *J Pharmacol Exp Therap* 303:439-444.
- Yacobi K, Wojtowicz A, Tsafiriri A, Gross A. 2004. Gonadotropins enhance caspase-3 and-7 activity and apoptosis in the theca-interstitial cells of rat preovulatory follicles in culture. *Endocrinology* 145: 1943-1951.
- Yi F-X, Zhang AY, Campbell WB, Zou A-P, Breemen C, Li P-L. 2002. Simultaneous in situ monitoring of intracellular Ca⁺⁺ and NO in endothelium of coronary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H2725-H2732.
- Zhou J., Kumar T.R., Matzuk M.M. and Bondy C. 1997. Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. *Mol Endocrinol* 11 : 1924-1933.
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90:405-413.

ATP-Induced Apoptotic Cell Death in Porcine Ovarian Theca Cells Through P2X7 Receptor Activation

FRANCISCO G. VÁZQUEZ-CUEVAS, BERE JUÁREZ, EDITH GARAY, AND ROGELIO O. ARELLANO*

Laboratorio de Neurofisiología Celular, Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología UNAM, Apdo. Postal 1-1141, Querétaro, México

ABSTRACT Folliculogenesis modulation via distinct neurotransmitters is a well-documented phenomenon. Intraovarian purinergic signaling mechanisms have been identified previously in different species. However, the molecular elements involved and the physiological role of this purinergic signaling remain to be elucidated. Here, studies using RT-PCR amplification, immunoblotting, and immunofluorescence microscopy showed that murine and porcine ovaries express the P2X7 subtype receptor, a cationic receptor-channel operated by ATP. Using immunofluorescence it was demonstrated that P2X7 protein expression, in both mouse and pig, occurs specifically in the theca cells from antral follicles. Isolated porcine theca cells maintained in primary cultures and tested with 1 mM ATP or 250 μ M Bz-ATP, a specific agonist of P2X7, responded with an increase in intracellular calcium concentration, as demonstrated in cells loaded with fluo-4 as calcium indicator. This strongly suggested that P2X7 receptors in theca cells are functional. Moreover, application for 24 hr of 1 mM ATP or 250 μ M Bz-ATP induced apoptotic cell death as indicated by the DNA fragmentation pattern, positive TUNEL test, and annexin V binding. This ATP effect was antagonized by 300 μ M PPADS and 200 μ M oxidized ATP. Also, addition of 5 mM EGTA in the external medium to chelate free Ca^{++} decreased death cell to 24% of that produced by 200 μ M Bz-ATP, suggesting that Ca^{++} influx participates in the phenomenon. The highly specific and functional expression of P2X7 receptors in theca cells suggest a role for ATP in modulating follicular physiology. *Mol. Reprod. Dev.* 73: 745–755, 2006. © 2006 Wiley-Liss, Inc.

Key Words: purinergic neurotransmission; ovary; theca cells

INTRODUCTION

In the ovary, selection of ovulatory follicles is a constant process and represents an essential phenomenon in normal follicular development. In this selection only a small fraction of follicles finish their full growth and development, and the rest are eliminated. At least 99% of follicles in the mammalian ovary undergo follicular atresia, a cellular degeneration that involves

apoptosis in both somatic and germinal follicular cells and is present in all states of follicular growth (see, Hsueh et al., 1994). At least 50% of antral follicles in mammals suffer atresia (Greenwald and Roy, 1994); this is the default pathway in follicular development, while the main survival signal is the preovulatory peak of FSH (Braw and Tsafirri, 1980). The role of the different follicular cell types in atresia is fundamental for an understanding of the regulation of folliculogenesis.

Theca is the external layer surrounding the ovarian follicle. Its physiological role in the synthesis of androgens from acetate or cholesterol is well known: Androgens serve as substrate for estradiol and progesterone synthesis in granulosa cells (Bjersing, 1978). Also, theca cells mediate the nutrient flow into the follicle because they form the vascularized layer closest to the oocyte. In addition, theca receives and integrates cellular signaling of transmitters transported through blood flow and the peripheral nervous system (Burden, 1985). It has been described that during follicular atresia, theca cells are hypertrophied and included within interstitial tissue (Himelstein-Braw et al., 1976). However, other morphological studies demonstrated that theca cells of atretic follicles undergo nuclear piknosis, a morphological signal of DNA condensation and degeneration (O'Shea et al., 1978). More recently, it has been shown that theca cells of atretic follicles of several species such as swine, beef, and rat undergo apoptosis (Tilly et al., 1992; Palumbo and Yeh, 1994; Isobe and Yoshimura, 2000). In vitro studies about signaling pathways that regulate apoptosis in theca cells have shown that these cells undergo apoptosis in response to transforming

Grant sponsor: CONACYT; Grant number: 40167Q; Grant sponsor: PAPPIT-UNAM; Grant numbers: IN221902, IX247404; Grant sponsor: CONACYT (Ph.D. scholarship); Grant number: 129597; Grant sponsor: DGAPA-UNAM.

*Correspondence to: Rogelio O. Arellano, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 1-1141, Querétaro, Qro., C.P. 76001, México.

E-mail: arellano-ostoa@inb.unam.mx

Received 17 October 2005; Accepted 26 December 2005

Published online 15 March 2006 in Wiley InterScience

(www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/mrd.20447

growth factor α (TGF- α) and TGF- β by modulation of the antiapoptotic protein Bcl-2 (Foghi et al., 1998b). Independently, apoptosis in theca cells can also be promoted through death receptor stimulation by Fas ligand (Foghi et al., 1998a).

In this study, we addressed the possible role of ATP-specific receptors expressed in theca cells during the apoptotic process. ATP exerts its extracellular actions through receptors named P2 that include two types: the P2X receptor channels permeable to cations and the P2Y receptors, which are G protein-coupled molecules that act primarily through the phosphoinositide- Ca^{++} pathway (Ralevic and Burnstock, 1998). Some functional actions generated by P2 receptor activation in the follicle have been already documented. For example, in the mouse cumulus cell-enclosed oocyte, ATP generates at least two ionic currents dependent on P2Y₂ receptor activation (Arellano et al., 2002). In the same model, ATP promotes Ca^{++} mobilization in the cumulus cells, and the wave of Ca^{++} increase propagates to the oocyte through gap junction channels (Webb et al., 2002). In cultured granulosa cells, ATP activates protein kinase C (Tai et al., 2001a) and the mitogen-activated protein kinase p42-p44 pathway (Tai et al., 2001b).

P2X receptor subunits present two putative transmembrane domains with intracellular amino and carboxy termini. Like all members of this receptor type, the binding of ATP results in opening of channels permeable mainly to Na^+ , K^+ , and Ca^{++} ions (Ralevic and Burnstock, 1998). P2X7 is an ATP-gated ion channel frequently associated with the activation of apoptosis in several cell systems. In addition, the typical P2X7 response to ATP involves an open channel nondesensitizing state, which is permeable to hydrophilic molecules of a molecular weight up to 900 Da (Rassendren et al., 1997). In the present work, we show specific expression of the P2X7 receptor in theca cells of the mammalian ovary and provide evidence that P2X7 stimulation of theca cells promotes apoptotic cell death. This is the first characterization of a possible physiological role of extracellular ATP signaling in ovarian theca cells.

MATERIALS AND METHODS

Materials

ATP, UTP, adenosine (Ado), 2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl)adenosine 5'-triphosphate (Bz-ATP), adenosine 5'-triphosphate periodate oxidized sodium salt (Ox-ATP), pyridoxal phosphate-6-azo (benzene-2,4-disulfonic acid) tetrasodium salt (PPADS), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), DMEM/nutrient mixture F12 Ham mix, and Hank's solution were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Antibodies were from Chemicon International Inc. (Temecula, CA) and Alomone Labs, Ltd. (Jerusalem, Israel). Fluo-4 was from Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR). Reverse transcriptase, oligo dT, *taq* polymerase, oligonucleotides, and other molecular biology reagents were from Invitrogen Co. (Carlsbad, CA). Fetal bovine serum (FBS), L-

glutamine, and antibiotic-antimycotic were from Gibco Invitrogen Co. (Grand Island, NY).

Cell Isolation and Culture

Porcine ovaries were obtained from a local slaughterhouse, collected in L-15 medium (Gibco) containing 5% FBS and antibiotic-antimycotic given above. Antral follicles (>4 mm) were isolated manually using fine forceps under a stereoscopic microscope and cleaned of interstitial tissue. Follicles were opened, granulosa cells were gently removed, and the theca layer was manually dissected and incubated in 1 ml of 0.025% trypsin and 5 mg/ml DNase I in Hank's solution (30 min at 37°C). The preparation was vigorously shaken, allowed to settle for 5 min, and the supernatant containing undesired granulosa cells was removed by decantation. Theca layers were dispersed by incubation in 1 ml of 1 mg/ml collagenase type II and 5 mg/ml DNase I (30 min at 37°C) in Hank's solution. Cells were homogenized by passing repeatedly through a Pasteur pipette, centrifuged 5 min at 1,000 rpm, and the supernatant was replaced by 1 ml of culture media (DMEM/HAM-F12 1:1) containing 1% FBS and antibiotic-antimycotic. Cells were dispersed, plated in 3 cm culture dishes in DMEM/HAM-F12 (1:1) containing 1% FBS, and incubated. After 2 hr, the culture medium was replaced to eliminate unattached cells, and the cultured cells were incubated for 12–48 hr at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cells obtained by this procedure were 95% viable as assessed using the trypan blue exclusion assay.

Immunohistochemistry and Immunocytochemistry

Ovaries of female mice (3 months) or porcine antral follicles (>4 mm) were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 for 4 hr at room temperature, incubated overnight in 30% sucrose in PBS pH 7.4, and finally suspended in Jun Tissue freezing solution (Leica, Wetzlar, Germany), frozen at -20°C, and sectioned in 10 μm serial cuts using a cryostat (Leica CM1850). Slices were collected on gelatinized slides and stored at -80°C. For immunodetection, tissue was thawed and fixed for 7 min with 4% PFA, washed with PBS, and treated with blocking solution containing 4% goat serum in PBS, washed again, and incubated overnight with the primary antibody, anti-P2X7 rabbit IgG (dilution 1:200) in blocking solution. Slides were PBS washed and incubated for 1 hr with the second antibody, goat antirabbit coupled to rhodamine (dilution 1:200), mounted in DABCO, and analyzed by fluorescence microscopy. For double labeling, anti-P2X7-treated slices were subsequently incubated with mouse antibody against cytochrome P450 side chain cleavage enzyme, followed by FITC-coupled goat antimouse IgG.

For immunocytochemistry cells, were grown on poly-D-Lysine-treated cover slides. Semi-confluent

cultures were fixed in 4% PFA for 25 min, washed with PBS, and blocked with 4% goat serum in PBS. The immunodetection procedure was performed as described above.

Intracellular Ca⁺⁺ Mobilization

Porcine ovarian theca cells were grown on cover slides pretreated with poly-D-Lysine. Semi-confluent cultures were loaded 30 min with 5 μ M fluo-4/AM and 0.1% pluronic acid in Krebs solution (in mM: 150 NaCl, 1 KCl, 1 MgCl₂, 1.5 CaCl₂, 4 glucose, 10 HEPES, and 0.05% BSA, pH 7.4). The cells were washed with Krebs solution for 10 min and placed in a recording chamber with constant flow, located in an inverted fluorescence microscope (Olympus, Melville, NY) equipped with an *Evolution QEi* camera (Media Cybernetics, USA). Images were analyzed using the *Image-Pro Plus* software (Media cybernetics).

Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

Total RNA of mice or porcine ovaries was purified by the guanidine isothiocyanate method (Chomezynski and Sacchi, 1987). First strand cDNA was synthesized using reverse transcriptase, 1 μ g of DNase-treated RNA, oligo(dT), and random hexamers as primers in a total volume of 50 μ l. The cDNA synthesized was used as template in a polymerase chain reaction. For mouse P2X7 subunit amplification, we used specific oligonucleotides; the forward sequence was 5' CATATGACAA-GACAAGGAAGAC 3', the reverse sequence was 5' GGTTGCAATCCAGTAGATCTC 3', and the expected amplified sequence is a 324 bp fragment. PCR was carried out for 35 cycles each 94°C for 50 sec, 55°C for 60 sec, and 72°C for 50 sec, followed by 5 min at 72°C. For swine, we utilized oligonucleotides designed against the aligned sequences of bull (*Bos Taurus*) and rat (*Ratus norvegicus*) (Ramirez and Kunze, 2002). The forward sequence was 5' AAG AGC CTG TCA TCA GTT CTG TGC AC 3', the reverse sequence was 5' AGA TCT CAA TGC CCA TGA TTC CTC CC 3', and the expected amplified product is a 614 bp fragment. PCR conditions were 50 sec at 94°C, 60 sec at 60°C, and 50 sec at 72°C for 40 cycles, followed by 5 min at 72°C. The amplified sequence was gel-isolated, phenol-chloroform purified, and subcloned in pGEM-T vector (Promega Co., Madison, WI). The nucleotide sequence was confirmed by automatic sequencing.

Western Blot

Brain and ovary protein homogenates were obtained by mechanical disruption of tissue in a polytron homogenizer, followed by sonication in homogenization buffer: 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 3 mM MgCl₂, 20 mM EDTA, 100 mM NaCl, and protease inhibitor mix (Roche Co., Basel, Switzerland). Cultured theca cells were scraped in homogenization buffer containing 250 mM sucrose and disrupted with a Dounce homogenizer. In all extracts, the total protein concentration was deter-

mined by the Bradford method. For electrophoresis, 10 μ g of each sample were diluted in 1 volume of Laemlli buffer, run on a 10% SDS-polyacrylamide gel, and transferred to a nitrocellulose membrane (BioRad, Hercules, CA). Filters were blocked for 2 hr at room temperature in 20 mM Tris, pH 7.4, 0.05% Tween 20 (TBS-T) containing 5% nonfat dry milk and then incubated overnight at 4°C with a rabbit primary antibody (1:1,000) directed against the P2X7 receptor that recognized the peptide 576-595 localized in the carboxy terminus of the rat P2X7 receptor subunit (Chemicon International Inc.). After washing with TBS-T, membranes were incubated 1 hr at 37°C with peroxidase-conjugated goat antirabbit antibody (Bio Rad) in TBS-T containing 5% nonfat milk. After washing, the immunoreactive proteins were detected by addition of diaminobenzidine substrate solution.

DNA Fragmentation Assay

After stimulation by ATP or Bz-ATP, cultured theca cells were rinsed with PBS, incubated in 300 μ l ice-cold lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, and 0.05% SDS) for 30 min, and treated with RNase (1 mg/ml, 1 hr at 37°C) and 0.2 mg/ml proteinase K (40 min at 37°C). After enzymatic treatment, DNA was extracted by addition of 500 μ l phenol/chloroform (1:1 v/v) and precipitated from the aqueous phase with 2 volumes of ethanol, washed with 70% ethanol, diluted in deionized water, and analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis.

TUNEL Assay

DNA fragmentation in situ was visualized by terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL), utilizing the *death end colorimetric kit* (Promega) according to manufacturer's instructions. In brief, cells were grown on poly-D-lysine-treated cover slides. Two hours before the experiment, medium was replaced with serum-free DMEM. The cells were stimulated or not with ATP for 24 hr. Cells were washed, fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS, permeabilized with 1% Triton X-100, incubated with hydrogen peroxide to block endogenous peroxidase activity, and washed gently. Then, cells were incubated 1 hr with the TUNEL reaction mixture containing enzyme and biotinylated nucleotides, rinsed three times with PBS, and incubated 30 min with streptavidin-horseradish peroxidase conjugate. The reaction was visualized with diaminobenzidine substrate solution and analyzed using light microscopy.

Annexin V Binding Assay

The annexin V binding assay was performed with annexin V conjugated to Cy3 (Sigma Chemical Co.). Cells were cultured in poly-D-lysine-treated cover slides. Before the experiment, cells were serum deprived and stimulated with the indicated drugs. At the indicated time cells were rinsed twice with PBS, three times with

binding buffer (10 mM HEPES pH 7.5, 140 mM NaCl, and 2.5 mM CaCl₂), and then incubated with Cy3-conjugated annexin V for 10 min. Finally, labeled cells were rinsed five times with binding buffer and observed through an inverted fluorescence microscope.

RESULTS

P2X7 Expression in Mouse Ovary

Previous work in the mammalian ovary strongly suggested a role for ATP signaling in the ovarian physiology (e.g., Tai et al., 2001a,b; Arellano et al., 2002; Webb et al., 2002). Here we have analyzed the expression of purinergic receptors using different techniques. From this analysis it was clear that the P2X7 subunit was one of the strongest, most consistent, and specifically localized proteins expressed during folliculogenesis. Total protein extracts from mouse ovary were analyzed by Western blot using a commercial antibody against the carboxy terminus of the rat P2X7 receptor subunit. The rat and mouse receptor amino acid sequences are 90% similar. Both rat and mouse brain extracts, used as positive control tissues, showed two main immunoreactive bands, one corresponding to a mass of ~70 kDa and a second faint band of ~65 kDa. According to previous studies, the 70-kDa band corresponded to the receptor (Ramirez and Kunze, 2002; Schrier et al., 2002). The second band might correspond to a proteolytic fragment of the receptor either present in the cells or generated during extraction. Rat and mouse brain showed a similar pattern with equivalent relative abundance, while the mouse ovary extracts were also positive for a ~70 kDa band, but the faint 65 kDa band was not detected (Fig. 1A).

RT-PCR amplification experiments confirmed the presence of the P2X7 receptor subunit in rat and mouse ovary. A 324 base pair fragment of the P2X7 receptor transcript was amplified from mouse ovary RNA with specific oligonucleotides (Fig. 1B), and its mobility in agarose gel electrophoresis was identical to the product amplified from mouse brain. The sequence of this amplicon corresponded to that of the 472 to 792 base cDNA of the P2X7 receptor reported previously (Chesell et al., 1998; NCBI #NM011027).

Next, we examined the expression pattern of P2X7 receptor in the ovary by immunohistochemically labeling slices of adult mouse ovary on the day of estrous (Fig. 2). Strong and specific P2X7 protein expression was detected in theca cells of antral follicles using the same antibody employed for Western blot analysis; this result was confirmed using a different antibody (Alomone) directed against a peptide that corresponds to amino acids 555–569 at the carboxy terminus of the rat P2X7 monomer. The receptor expression pattern in the ovary showed a strong signal surrounding secondary and antral follicles and the ovarian epithelium, but no labeling in granulosa cells, the corpora lutea, or interstitial tissue (Fig. 2B). Immunoreactive cells surrounding the follicles were morphologically identified as the theca layer. This result was further confirmed in

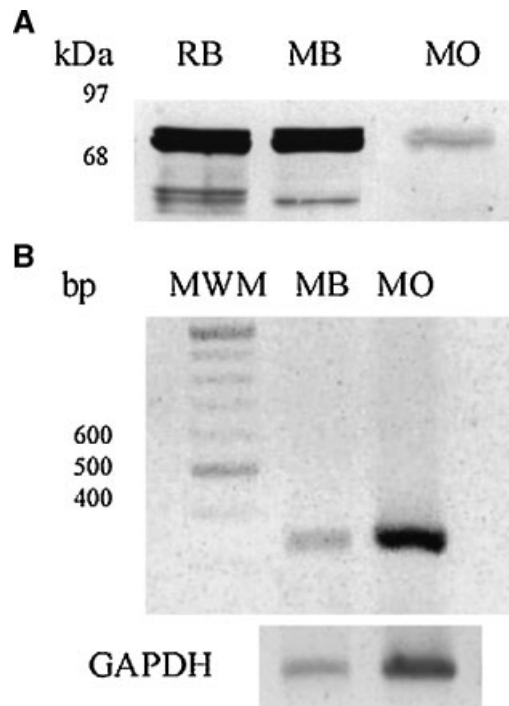


Fig. 1. Expression of P2X7 receptor subunit in the mouse ovary detected by Western blot and RT-PCR amplification. **A:** The P2X7 receptor subunit was detected by Western blot in homogenates of rat brain (RB), mouse brain (MB) (control tissues), and mouse ovary (MO). The P2X7 receptor is identified as a ~70 kDa band and was evident in all tissues analyzed. **B:** MB and MO total RNA was reverse transcribed, and the cDNA obtained was used as template for PCR amplification of the mouse P2X7 receptor fragment (314 bp) using specific oligonucleotide primers. GAPDH was used as the internal control for the RT-PCR procedure.

experiments where immunoreactivity to P2X7 antibody colocalized with labeling of cytochrome P450 side chain cleavage enzyme, an enzyme of the steroidogenic pathway expressed specifically in theca cells (Isobe et al., 2003) (Fig. 2C).

In summary, results of analyses by Western blot, PCR amplification, and immunohistochemistry localization all clearly indicated the specific expression of P2X7 receptors in the theca cells of the mouse ovary.

Expression of P2X7 Receptor in Porcine Ovary

P2X7 immunodetection studies in mouse ovary showed a specific expression in the theca cells surrounding secondary and antral follicles. In order to explore the possible physiological role of the P2X7 receptor in these cells, a theca cell culture was established from porcine ovary. In this species the theca layer can be dissected manually, and it yields an adequate number of cells for experimental manipulations. Expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and cytochrome P450 side chain cleavage enzyme in fresh purified theca and in cultured cells was documented by RT-PCR amplification, and both enzymes are markers of ovarian theca cells (data not shown).

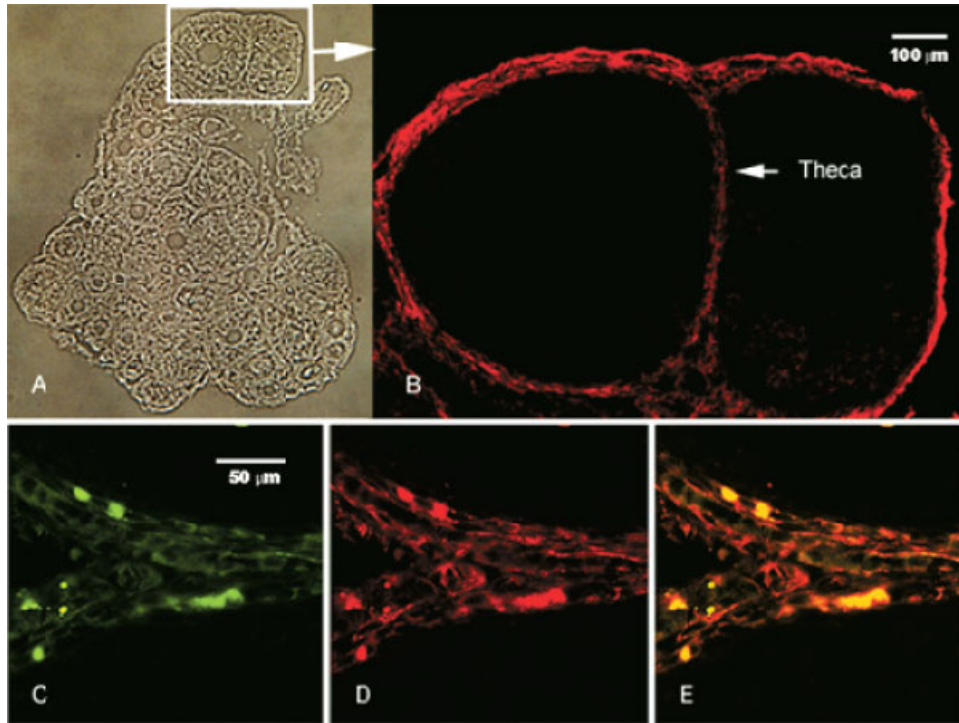


Fig. 2. Immunohistochemical detection of P2X7 receptor in the mouse ovary. **A:** Mouse ovary slice (10 μm) visualized using phase contrast microscopy. **B:** Receptors were localized employing a primary antibody against the carboxy-terminus of the rat P2X7 receptor and secondary antibody coupled to rhodamine. Labeling for P2X7 was observed specifically in theca cells. **C–E:** To confirm the location of

P2X7 specific labeling, theca cells were double labeled with antibody against the P2X7 receptor as above (D) and also with an antibody against the cytochrome P450 side chain cleavage enzyme (C, secondary antibody coupled to FITC). **E:** Merged images shown in (C) and (D) confirmed colocalization of these two proteins in theca cells. [See color version online at www.interscience.wiley.com.]

Strong and specific P2X7 protein expression was also detected by immunolabeling in both antral pig follicle slices (Fig. 3A) and theca cell monolayers in culture (Fig. 3C). Immunohistochemical labeling in slices of pig antral follicles showed a strong signal in theca. This layer was morphologically identified by comparing fluorescence versus hematoxylin-eosine staining (Fig. 3B); the characteristic theca layer vascular network allowed its unambiguous identification. Also, the theca layers from several follicles were used to establish monolayer cultures, where immunocytochemical labeling gave a similar, strong signal in membrane and perinuclear areas (Fig. 3C); this observation was consistent with previous reports for P2X7 localization in smooth muscle and endothelial cells (Ramirez and Kunze, 2002; Menzies et al., 2003). Western blot detection confirmed P2X7 expression in homogenates of cultured theca cells (Fig. 3D); two immunoreactive bands were detected, the 70 kDa band corresponding to the molecular mass of the receptor and a \sim 200 kDa band. The latter band might correspond to aggregation of the receptor subunit with itself or with some other proteins, but a possible immunological recognition of a second and unknown protein in swine cannot be excluded. As porcine P2X7 has not been yet cloned, total RNA from freshly isolated theca cells of the pig ovary was analyzed by RT-PCR using specific oligonucleotides designed versus the aligned sequences of beef and rat

(Ramirez and Kunze, 2002); this strategy allowed amplification of a 610 bp fragment, and automatic sequencing confirmed the identity of the amplicon (NCBI #AY894135). Clustal Wallis analysis of the sequence (<http://www.ebi.ac.uk/cgi.bin>) was conducted versus existing sequences of human, rat, and mouse (NCBI accession numbers: NM002562, NM019256, and NM011027, respectively). The identity values of the porcine P2X7 fragment were 91% with the human sequence and 79% with the rat and mouse sequences. Together, these results indicated that, as shown in mouse, the porcine theca cells expressed P2X7 receptors, and these cells can be used as a model to study physiological roles of the P2X7 receptor.

ATP-Induced Intracellular Ca^{++} Increase in Porcine Theca Cells

The results described showed that the porcine theca cell membrane is endowed with P2X7 receptors. In order to determine if the receptor is functional or not, changes in intracellular Ca^{++} concentration ($[\text{Ca}^{++}]_i$) induced by purinergic substances were measured (Fig. 4). Theca cell cultures were loaded with 5 μM fluo-4 AM and placed in the recording chamber of a fluorescence inverted microscope, cells were stimulated with different drugs, and data were collected with a computerized camera system. 1 mM ATP induced the maximum increment in fluorescence of $100 \pm 11.2\%$ ($n = 47$ cells from three

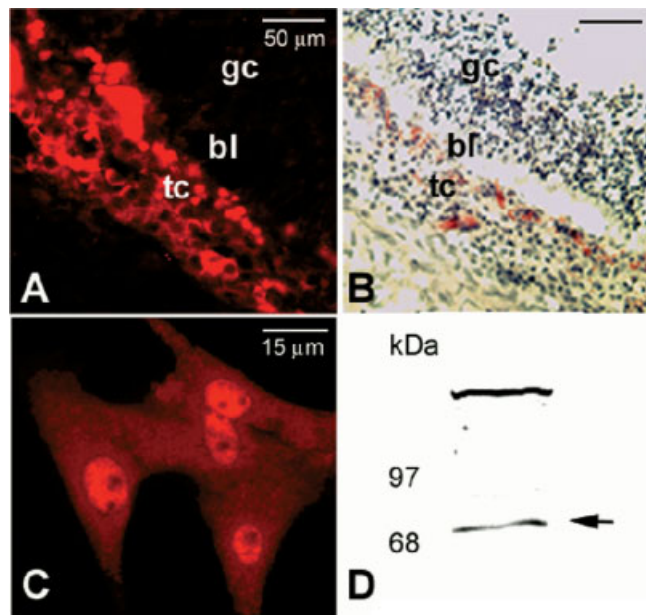


Fig. 3. Immunohistochemical detection of P2X7 receptor in porcine follicles. **A:** P2X7 receptors were localized in slices of porcine follicles employing a primary antibody against the rat purinergic receptor and a secondary antibody coupled to rhodamine. **B:** Hematoxyline-eosine preparation of the same slice shown in (A) showing the location of granulosa cells (gc), basal lamina (bl), and theca cells (tc) within the ovarian structure. **C:** Cultured porcine theca cells stained by the same procedure as for P2X7 immunodetection. **D:** Western blot detection of P2X7 in homogenates of cultured porcine theca cells. [See color version online at www.interscience.wiley.com.]

different cultures), while 1 mM UTP increased fluorescence $55 \pm 7.8\%$ ($n = 22$ cells from two different cultures), and a specific agonist of P2X7 receptor such as Bz-ATP (250 μM) evoked an increase of $47 \pm 4.7\%$ ($n = 24$ cells from two different cultures) (Fig. 4A). However, image analysis of single cell responses to UTP and Bz-ATP showed clear differences in the subcellular regions where the $[\text{Ca}^{++}]_i$ increase occurred (Fig. 4B,C). Thus, UTP induced a $[\text{Ca}^{++}]_i$ increase mainly in the nuclear region, while Bz-ATP induced a $[\text{Ca}^{++}]_i$ increase throughout the whole cell. These results agree with the pattern of $[\text{Ca}^{++}]_i$ increase expected for the involvement of metabotropic receptors (UTP-activated) or receptor-channel proteins (Bz-ATP-activated). All this strongly suggested that the $[\text{Ca}^{++}]_i$ increase observed in response to ATP was due to metabotropic receptors, in

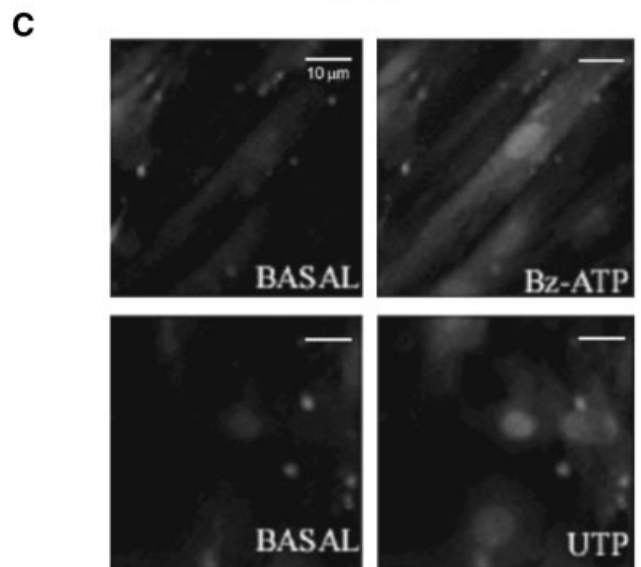
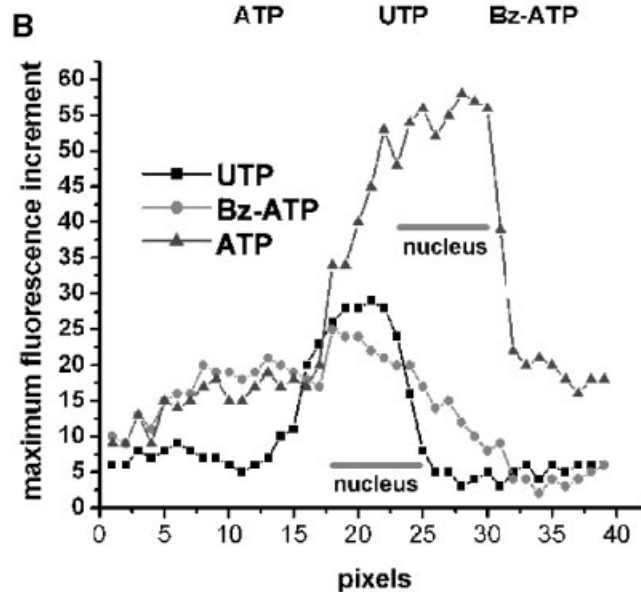
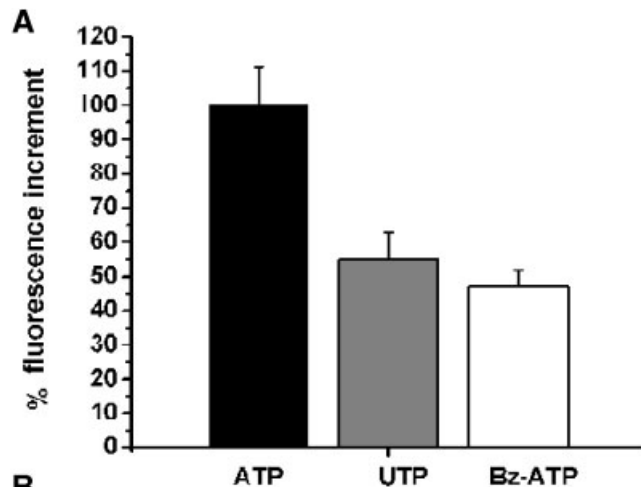


Fig. 4. Purinergic agonist-evoked $[\text{Ca}^{++}]_i$ increase in theca cells. Cultured porcine theca cells were loaded with fluo-4/AM, and $[\text{Ca}^{++}]_i$ was monitored with fluorescence microscopy. **A:** Plots show the mean (\pm SEM) of maximum fluorescence increase in response to 1 mM ATP, UTP, or 250 μM Bz-ATP (20 sec applications). **B:** UTP and Bz-ATP increased $[\text{Ca}^{++}]_i$ to a similar extent; however, they display different spatial patterns. This is shown in the analysis made of individual cells, for which fluorescence intensity was measured along an arbitrary line crossing the whole cell including the nucleus. **C:** Representative pictures illustrate that Bz-ATP evoked an homogeneous calcium increase while the UTP-elicited calcium increase mainly involved the perinuclear region.

addition to opening of P2X receptor-channel proteins of the P2X7 subtype.

Extracellular ATP-Induced Cell Death and DNA Fragmentation in Cultured Theca Cells

ATP receptors have been associated with apoptosis in distinct cellular types. To explore the effect of ATP receptor activation on theca cell viability and DNA fragmentation, cells were cultured for 48 hr and incubated in serum-free DMEM 2 hr before ATP application. Serum deprivation up to 36 hr did not induce cell death. Incubation with 1 mM or 5 mM ATP for 24 hr induced death of 96% of the cells, as determined by trypan blue exclusion; this effect was observed in 10 of

11 cultures (data not shown). Dead cells showed apoptotic morphological characteristics such as chromatin condensation, cytoplasmic tightening, membrane blebbing, and formation of apoptotic bodies (Fig. 5A,B,D,E). In order to determine whether or not theca cell death involved apoptosis, genomic DNA of control and ATP-stimulated cells was purified and analyzed by electrophoresis. Genomic DNA fragmentation is a hallmark of apoptotic cell death. Both mitochondria-dependent and ligand-activated apoptotic cascades involve caspase-dependent DNase activation; this produces internucleosomal DNA digestion and consequently the characteristic electrophoretic ladder pattern (Hsueh et al., 1994). As a positive control experiment, theca cells from the same

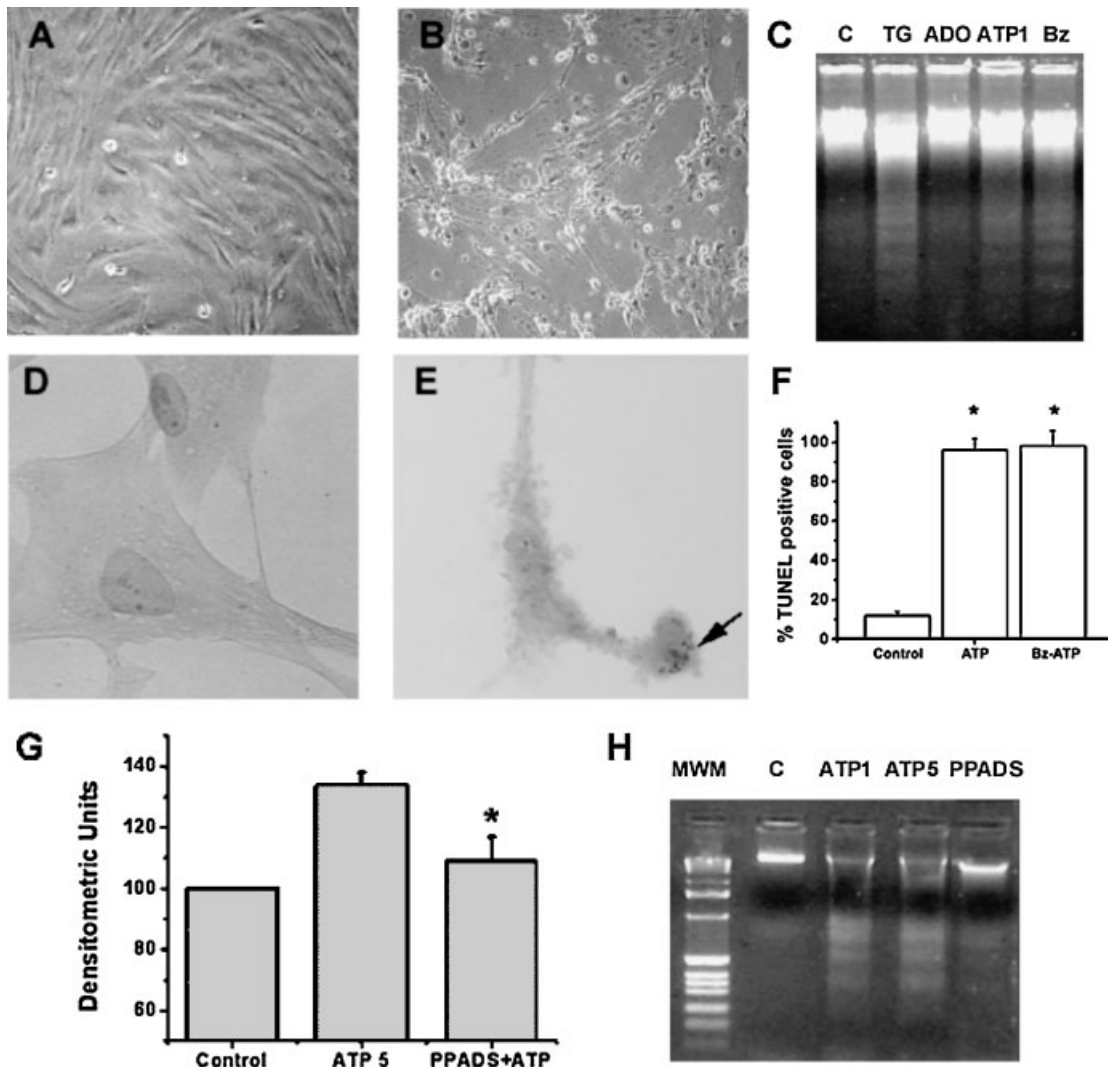


Fig. 5. ATP induces apoptotic cell death in cultured porcine theca cells. Cells cultured were incubated in the absence (A and D) or presence of 1 mM ATP (B and E) for 24 hr. Purinergic stimulus induced cell death with morphological apoptotic characteristics. Images in (A) and (B) were obtained by direct phase contrast microscopy (20 \times), while those in (D) and (E) are from cells (100 \times) processed for the TUNEL assay (arrow in (E) signals label of DNA). C: ATP-treated cells showed genomic DNA fragmentation apparent after 1.5% agarose gel electrophoresis. Lanes corresponded to: TG, 100 nM thapsigargin as positive

control; ADO, 1 mM adenosine; ATP 1, 1 mM ATP and Bz, 250 μ M of Bz-ATP, respectively. F: Plot shows the mean (\pm SEM) of positive cells in the TUNEL assay as the percentage of total number of cells in fields from three independent experiments in control conditions, or for cells incubated in 1 mM ATP or 250 μ M Bz-ATP an agonist of P2X7 receptors ($*P < 0.01$ vs. control). G, H: ATP-induced cell death was blocked with PPADS as shown by densitometric analysis of low weight DNA in the ladder pattern and representative pictures ($*P < 0.05$ vs. ATP).

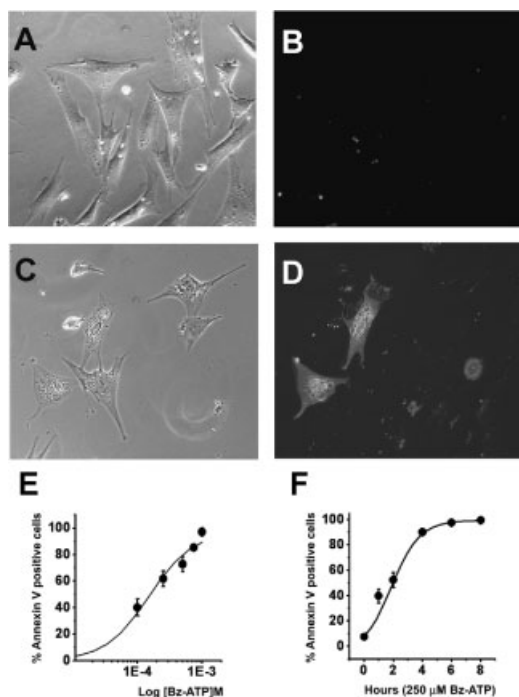


Fig. 6. Annexin V binding analysis was used to characterize the Bz-ATP cell death induction. Control cells (A, B) or cells incubated for 2 hr with 250 μ M of Bz-ATP (C, D) were probed with the annexin V binding assay (B and D). Dose-response (E) and temporal course (F) graphs of the Bz-ATP (250 μ M) induced response are shown.

cultures were stimulated with 10 nM thapsigargin, an inhibitor of the Ca^{++} -ATPase from the endoplasmic reticulum. This drug has been used extensively as an apoptotic agent because it induces cytosolic calcium accumulation and mitochondria-dependent apoptosome activation (McConkey et al., 1996). Theca cells responded to thapsigargin with cell death and DNA ladder patterns (Fig. 5C). Importantly, this typical DNA pattern was observed in 54.5% of the ATP-stimulated cultures analyzed (6 of 11) (Fig. 6C). To confirm that this response was mediated directly by ATP and not by adenosine, theca cell cultures were incubated with 1 mM of this nucleoside for 24 hr. Adenosine treatment induced neither cell death nor DNA fragmentation (Fig. 5C). To substantiate these observations, DNA was labeled in situ with the TUNEL assay to detect DNA bodies and nuclear fragmentation, and the morphology of ATP-treated cells was analyzed under 100 \times magnification. This preparation showed characteristic blebbing of the plasma membrane and also formation of apoptotic bodies, both of which are indicative of apoptotic cell death. ATP-stimulated theca cells showed positive TUNEL signal in three independent experiments (Fig. 5E,F). These findings strongly suggest the participation of an apoptotic pathway in ATP-stimulated theca cell death. Likewise, DNA fragmentation and apoptotic morphological changes evidenced by TUNEL assays were also produced by stimulation of theca cells with Bz-ATP (250 μ M, Fig. 5C,F). In addition, in presence of 1 mM ATP, PPADS (300 μ M), a nonspecific antagonist of P2X receptors

(Lambrecht et al., 1992), blocked cell death and formation of the DNA ladder pattern in 3 of 5 experiments (Fig. 5G,H); higher antagonist concentrations were toxic for cells. Oxidized ATP, a selective P2X7 antagonist (200 μ M, Murgia et al., 1993), completely blocked cell death induction in three independent experiments. All this data suggested that P2X7 participates in ATP-induced cell death of ovarian theca cells.

To further assess this suggestion, the annexin V binding assay was used (Fig. 6). This assay detects phosphatidylserine translocation to the external face of plasma membrane, an early effect in the apoptotic phenomenon, which makes it a more reliable method to quantify the apoptotic process. Thus, cultured theca cells ($n = 3$) stimulated with either ATP (1 mM) or Bz-ATP (200 μ M) induced, within a 2-hr incubation period, a typical annexin V label, which signals the onset of the apoptotic process (Fig. 6A–D). Further experiments using Bz-ATP treated cells showed that this P2X7 receptor agonist produced annexin V binding over the whole concentration range tested (100 μ M to 1 mM, Fig. 6E). The estimated EC50 value for Bz-ATP was \sim 150 μ M, and the temporal course for this effect (applying 250 μ M Bz-ATP) indicated that 50% of cells were annexin V positive in around 2 hr. Consistent with the results described above, the annexin V binding studies strongly suggested that P2X7 receptor activation is involved in ATP-induced theca cell death.

Cell Death Induction in Cultured Theca Cells Depends on Extracellular Calcium

The P2X7 channel receptor has been shown previously to be involved in the apoptotic process, and the mechanism proposed for this effect is the following: Opening of P2X7 channels produces a sustained membrane depolarization and an increase in cytosolic free calcium that enhance the mitochondrial membrane permeability by activation of the mitochondrial permeability transition pore. Consequently, this disrupts the mitochondrial membrane potential and generates the release of proapoptotic factors such as cytochrome C (Kantrow and Piantadosi, 1997) that activate the apoptotic machinery. This apoptotic response mediated by the P2X7 purinoceptors has been shown in cells such as macrophage (Ferrari et al., 1997), immune dendritic cells (Countinho-Silva et al., 1999), and mesangial cells of the kidney (Schulze-Lohoff et al., 1998).

In order to obtain information about the mechanism involved in the ATP-induced death in theca cells, the free Ca^{++} concentration in the external medium was reduced, and then the cells were treated with Bz-ATP. The approach used to reduce the extracellular calcium was to chelate the cation by adding 5 mM EGTA to the medium; under these conditions the free Ca^{++} concentration is expected to be reduced to below μ M range (e.g., Yi et al., 2002). Within 15–20 min this manipulation had a deleterious effect on the cells (four different theca cell cultures), and this EGTA effect was not further studied. However, addition of 5 mM EGTA together with 2–5 mM of Mg^{++} allowed theca cells to survive for more

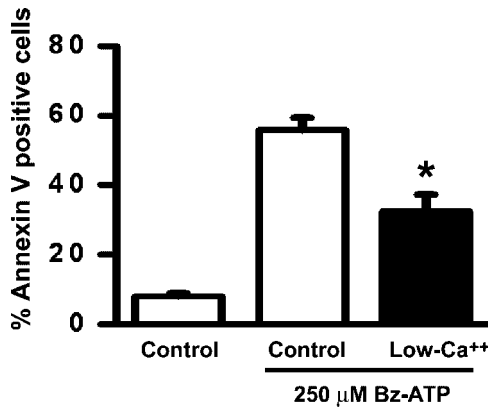


Fig. 7. Apoptosis induced by Bz-ATP depends on extracellular Ca⁺⁺ concentration. Graph shows the percentage of cells that undergo apoptosis within 2 hr after treatment without or with 250 μ M Bz-ATP in control medium (empty columns), as quantified using the annexin V assay. The number of apoptotic cells treated with 250 μ M Bz-ATP was reduced in a medium where Ca⁺⁺ was decreased by adding 5 mM EGTA (and 2 mM Mg⁺⁺; solid column). * $P < 0.05$ control versus stimulated with Bz-ATP.

than 5 hr. Treatment of the theca cells with Bz-ATP (250 μ M) for 2 hr in EGTA-Mg⁺⁺ medium reduced the percentage of cells positive for the annexin V assay from 55% to 32%, compared with cells in control medium (Fig. 7); this effect was observed in four independent experiments. These results suggested that calcium influx from extracellular medium is an important element in the mechanism that induced apoptosis in ovarian theca cells.

DISCUSSION

Although early studies reported that in the atretic follicle, theca cells undergo hypertrophy and incorporation into the interstitial tissue (Himelstein-Braw et al., 1976), later morphological studies demonstrated that the cells surrounding the atretic follicle develop nuclear piknosis, evidence of DNA fragmentation that is characteristic of the apoptotic process (O'Shea et al., 1978). Recently, it has been shown that theca cells undergo apoptosis in atretic follicles of swine, beef, and rat (Tilly et al., 1992; Palumbo and Yeh, 1994; Isobe and Yoshimura, 2000). These facts imply that theca cell death is important in the induction or progression of follicular atresia. Cellular messengers that induce apoptosis in theca cells have been described in vitro and include TGF- α and TGF- β (Foghi et al., 1998a), luteinizing hormone (Yacobi et al., 2004), and Fas ligand (Foghi et al., 1998b).

In the present study, we demonstrated that P2X7 receptors are expressed in ovarian theca cells from mouse and pig; in vitro studies showed that these receptors are functional, and they mediate the action of ATP as apoptotic inducer in theca cells, suggesting a possible role for signaling via ATP during follicular development.

The mouse P2X7 receptor subunit is a protein with a molecular mass of approximately 68.4 kDa (Chessell

et al., 1998). By Western blot analysis, we detected an immunoreactive band of \sim 70 kDa in ovary extracts, and a similar signal was obtained using brain as positive control. This result is in agreement with previous studies made in different tissues (Ramirez and Kunze, 2002; Schrier et al., 2002). Using immunocytochemistry to analyze P2 receptor expression in the female rat reproductive tract and ovary, it was found that P2X7 receptors are expressed in the vaginal epithelium and endometrial cells but not in ovarian tissue (Bardini et al., 2000). However, the presence of P2X7 transcripts in total RNA of mouse ovary was demonstrated here by RT-PCR, and the protein expression pattern in ovary slices was studied by immunofluorescence labeling. The results clearly showed a positive and specific signal in theca cells, and double labeling with cytochrome P450 side chain cleavage enzyme confirmed the cell type. Similarly, we also demonstrated expression of P2X7 receptors in pig ovary theca cells, in situ preparations as well as in purified theca cells maintained in culture. Receptor protein was also detected by Western blot and immunohistochemistry in homogenates of pig antral follicles. Although the complete porcine receptor has not yet been cloned and sequenced, we amplified a fragment of the porcine transcript from total RNA of freshly isolated theca cells by RT-PCR (NCBI #AY894135), and the sequence of the amplicon obtained showed 91% identity with the human receptor; this supports the idea that porcine theca cells express P2X7 receptors and might be used as a model cell to study their role in follicular physiology. A similar sequence for this receptor in pig has been reported recently (NCBI #AY691687).

The function of P2X7 receptors was monitored by measuring intracellular Ca⁺⁺ concentrations using fluorescence microscopy in isolated theca cells. The intracellular Ca⁺⁺ concentration ($[Ca^{++}]_i$) increased when the cells were stimulated by ATP and also by Bz-ATP, a P2X7 selective agonist. Although both agonists evoked $[Ca^{++}]_i$ increases, they clearly differed in potency, with ATP being more effective than Bz-ATP. This fact suggested that theca cells express Bz-ATP-insensitive P2 receptors. Among several purinergic drugs tested, UTP and Bz-ATP increased $[Ca^{++}]_i$ to a similar extent, indicating that P2Y G protein-coupled receptors are also present in theca cells. Bz-ATP evoked a global intracellular increase in calcium, whereas the UTP-induced calcium increase occurred mainly in the perinuclear region. This is consistent with the functional mechanisms demonstrated for P2X7 receptors and P2Y receptors activated by UTP in distinct cellular systems (Ralevic and Burnstock, 1998). In summary, the results showed that P2X7 receptors expressed in theca cell membranes are functional, and that ATP-induced $[Ca^{++}]_i$ increases are additive and involve at least two receptor subtypes.

P2X7 receptor activity is associated with apoptosis in several cell types (Ferrari et al., 1997; Schulze-Lohoff et al., 1998; Countinho-Silva et al., 1999; Ferrari et al., 1999). Here, it was shown by genomic DNA purification,

TUNEL assay, and annexin V binding that ATP induces apoptosis in theca cells maintained in vitro, and the pharmacological data strongly indicated that this ATP action is via P2X7 receptor stimulation. Some cultures that showed cell death did not display internucleosomal DNA fragmentation, which would suggest that ATP induced necrotic cell death, an effect that has also been documented in macrophage (Ferrari et al., 1999). Nevertheless, when the apoptosis process induced either by ATP or Bz-ATP was quantified using the annexin V assay, all cultures tested ($n = 8$) gave a positive result, indicating that the lack of a DNA ladder pattern might be due to something other than the absence of an apoptotic process.

It has been proposed that P2X7 activation allows a Ca^{++} concentration increase in the cytoplasm that mediates the activation of proapoptotic proteins (Countinho-Silva et al., 1999; Ferrari et al., 1999). Here, we show that the activation of P2X7 receptors in theca cells by Bz-ATP produced a $[Ca^{++}]_i$ increase and also that chelation of extracellular Ca^{++} by adding EGTA reduced the number of cells labeled with annexin V, strongly suggesting that calcium influx in theca cells is necessary to induce apoptosis. However, chelation of calcium did not inhibit completely the apoptotic process; this may be due to any one of several factors. For example, residual free calcium in the medium containing 5 mM EGTA, or involvement of a calcium-independent apoptotic pathway, which has been suggested to operate during P2X7 receptor activation (Mackenzie et al., 2005).

We hypothesized that in the context of ovarian physiology, the activation of the P2X7 receptor might function as an integrator of information from the peripheral nervous system. It is well established that ATP plays a role in sympathetic neuroeffector mechanisms, such as serving as a cotransmitter with norepinephrine (NE) (Burnstock, 1999). It has been demonstrated that the ovary is innervated by sympathetic components of the peripheral nervous system; this innervation establishes close contact where theca cells are localized; however, it does not cross the basal lamina (Burden, 1985; Lara et al., 2002). Also, in vivo experiments have shown that neurotransmission in the ovary is physiologically relevant; for example, pharmacological denervation in the prepuberal rat induces changes in the distribution of the follicular population (Lara et al., 1990). A possible explanation of these results is that the regulation of follicular atresia is altered. Although the discussion of these studies is focused on changes of catecholamine signaling, the results presented here raise the possibility that part of the effects observed are in fact the consequence of a concomitant alteration of purinergic signaling. ATP released from sympathetic terminals might activate P2X7 receptors in theca cells of antral follicles; this could evoke the death of theca cells by apoptosis or necrosis, and finally follicular atresia.

Another nonexclusive possibility is that ATP in the ovary functions as a trophic paracrine-autocrine modulator. ATP is a common cellular paracrine/autocrine

transmitter. Different effects of ATP have been studied in platelets, red blood cells, endothelial cells, smooth muscle cells, osteoblasts, pancreatic β -cells, Sertoli cells, and chondrocytes, and they can be stimulated by a large variety of agents or conditions including hypoxia, acidosis, mechanical deformation, osmotic shock, receptor stimulation, and mechanical stimulation (for review see Bodin and Burnstock, 2001). Recently it was shown that in *Xenopus* follicles there exists a purinergic system in which theca cells play a central modulatory role, and the main source of ATP in this system appears to be the oocyte itself (Maroto and Hamill, 2001; Saldaña et al., 2005). As has been shown in other species, ATP might also be released by distinct intrafollicular components exerting paracrine-autocrine effects, including induction of apoptosis.

In summary, the results described show that P2X7 receptors were expressed mainly in the follicular theca cells and that their activation by ATP could induce cell death in vitro, primarily by an apoptotic mechanism. This suggests that ATP affects follicle survival by acting as an intraovarian modulator.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. Dorothy D. Pless for help with the manuscript. We also thank for their expert technical assistance: Horacio Ramírez Leyva, Dr. Anaíd Antaramián Salas, Quim. Leonor Casanova Rico, Lic. Ma. de Lourdes Lara Ayala, Lic. María del Pilar Galarza Barrios, M.V.Z. Martín García Servín, M. en C. Alberto Lara Ruvalcaba, and I.S.C. Omar González Hernández. This study is supported by grants from CONACYT 40167Q, PAPPIT-UNAM IN221902, and IX247404 to R.O.A., and a Ph.D. scholarship from CONACYT 129597 and DGAPA-UNAM to F.G.V.-C.

REFERENCES

- 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.
- Bardini M, Lee HY, Burnstock G. 2000. Distribution of P2X receptor subtypes in the female reproductive tract at late pro-oestrous/early oestrous. *Cell Tissue Res* 299:105–113.
- Bjersing L. 1978. Maturation, morphology and endocrine function of the follicular wall in mammals. In: Jones RE, editor. *The mammalian ovary*. Comparative Biology. New York: Raven Press. pp 181–214.
- Bodin P, Burnstock G. 2001. Purinergic signaling: ATP release. *Neurochem Res* 26:959–969.
- Braw RH, Tsafiriri A. 1980. Effect of PMSG on follicular atresia in the rat ovary. *J Reprod Fert* 59:267–272.
- Burden HW. 1985. The adrenergic innervation of mammalian ovaries. In: Ben-Jonathan N, Bahr JM, Weener R, editors. *Catecholamines as hormone regulators*. New York: Raven Press. pp 261–278.
- Burnstock G. 1999. Purinergic cotransmission. *Brain Res Bull* 50:355–357.
- Chessell IP, Simon J, Hibell AD, Michel AD, Barnard EA, Humphrey PP. 1998. Cloning and functional characterization of the mouse P2X₇ receptor. *FEBS Lett* 439:26–30.
- Chomezynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Ann Biochem* 162:156–159.
- Countinho-Silva R, Persechini PM, Da Cunha R, Perfettini JL, Torres AC, Kanellopoulos JM, Motta-Ly I, Dautry-Varsat A, Ojcius DM.

1999. P2Z/P2X₇ receptor dependent apoptosis of dendritic cells. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 276:C1139–C1147.
- Ferrari D, Chiozzi P, Flazoni S, Susino MD, Melchiorri L, Baricordi OR, Di Virgilio F. 1997. Extracellular ATP triggers IL-1 β release by activating the purinergic P2Z receptors of human macrophages. *J Immunol* 159:1451–1458.
- Ferrari D, Los M, Bauer MKA, Vandenabeele P, Wesselborg S, Schultze-Osthoff K. 1999. P2Z purinoceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. *FEBS Lett* 447:71–75.
- Foghi A, Ravandi A, Teerds KJ, Van Der Donke H, Ksis A, Dorrington J. 1998a. Fas ligand apoptosis in rat theca/interstitial cells through sphingomyelin-ceramide pathway. *Endocrinology* 139:2041–2047.
- Foghi A, Teerds KJ, Van Der Donke H, Moore NC, Dorrington J. 1998b. Induction of apoptosis in theca/interstitial cells: Action of transforming growth factor (TGF) alpha plus TGF beta on Bcl-2 and interleukin-1 beta converting enzyme. *J Endocrinol* 157:489–494.
- Greenwald GS, Roy SK. 1994. Follicular development and its control. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The physiology of reproduction*, Vol 2. New York: Raven Press. pp 629–724.
- Himelstein-Braw R, Byskov AG, Peters H, Faver M. 1976. Follicular atresia in the infant human ovary. *J Reprod Fertil* 46:55–59.
- Hsueh AJ, Billing H, Tsafirri A. 1994. Ovarian follicle atresia: A hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Rev* 15:707–724.
- Isobe N, Yoshimura Y. 2000. Localization of apoptotic cells in the cystic ovarian follicles of cows: A DNA-end labeling histochemical study. *Theriogenology* 53:897–904.
- Isobe N, Nakao T, Yoshimura Y. 2003. Distribution of cytochrome P450-side chain cleavage in the theca internal layers of bovine small antral and cystic follicles. *Reprod Domest Anim* 38:405–409.
- Kantrow SP, Piantadosi CA. 1997. Release of cytochrome c from liver mitochondria during permeability transition. *Biochem Biophys Res Comm* 232:669–671.
- Lambrecht G, Friebe T, Grimm U, Windscheif U, Bungardt E, Hildebrandt C, Bäumert HG, Spatz-Kümbel G, Mutschler E. 1992. PPADS, a novel functionally selective antagonist of P2 purinoceptor-mediated responses. *Eur J Pharm* 217:217–219.
- Lara HE, McDonald JK, Ahmed CE, Ojeda SR. 1990. Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and function in rats. *Endocrinology* 127:2199–2209.
- Lara HE, Dorfman M, Venegas M, Luza SM, Luna SL, Mayerhofer A, Guimaraes MA, Rosa E, Silva AAM, Ramirez VD. 2002. Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary during a normal estrous cycle and in polycystic ovary syndrome: Studies on norepinephrine release. *Microscop Res Tec* 59:495–502.
- Mackenzie AB, Young MT, Adinolfi E, Surprenant A. 2005. Pseudoapoptosis induced by brief activation of ATP-gated P2X₇ receptors. *J Biol Chem* 280:33968–33976.
- Maroto 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.
- McConkey DJ, Greene G, Pettaway CA. 1996. Apoptosis resistance increases with metastatic potential in cells of the human LNCaP prostate carcinoma line. *Cancer Res* 56:5594–5599.
- Menzies J, Andrew P, Kennedy C. 2003. P2X₇ subunit-like immunoreactivity in the nucleus of visceral smooth muscle cells of the guinea pig. *Auton Neurosci Basic Clin* 106:103–109.
- Murgia M, Hanau S, Pizzo P, Rippa M, Di Virgilio F. 1993. Oxidized ATP: An irreversible inhibitor of the macrophage purinergic P_{2Z} receptor. *J Biol Chem* 268:8199–8203.
- O'Shea JD, Hay MF, Cran DG. 1978. Ultrastructural changes in the theca interna during follicular atresia in sheep. *J Reprod Fertil* 54:183–187.
- Palumbo A, Yeh J. 1994. In situ localization of apoptosis in the rat ovary during follicle atresia. *Biol Reprod* 51:888–895.
- Ralevic V, Burnstock G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharm Rev* 50:413–492.
- Ramirez AN, Kunze DL. 2002. P2X purinergic receptor channel expression and function in bovine aortic endothelium. *Am J Physiol (Circ Physiol)* 282:H2106–H2116.
- Rassendren F, Buell GN, Virginio C, Collo G, North A, Surprenant A. 1997. The permeabilizing ATP receptor, P2X₇. *J Biol Chem* 272:5482–5486.
- Saldaña C, Vázquez-Cuevas F, Garay E, Arellano RO. 2005. Epithelium and/or theca are required for ATP-elicited K⁺ current in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *J Cell Physiol* 202:814–821.
- Schrier SM, Florea BI, Mulder GJ, Nagelkerke JF, Ijzerman AP. 2002. Apoptosis induced by extracellular ATP in the mouse neuroblastoma cell line N1E-115: Studies on involvement of P2 receptors and adenosine. *Biochem Pharmacol* 63:1119–1126.
- Schulze-Lohoff E, Hugo C, Rost S, Arnold S, Gruber A, Brüne B, Sterzel R. 1998. Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured cells via P2Z/P2X₇ receptors. *Am J Physiol (Renal Physiol)* 275:F962–F971.
- Tai CJ, Kang SK, Choi KC, Tzeng CR, Leung PC. 2001a. Antigonadotropic action of adenosine triphosphate in human granulosa-luteal cells: Involvement of protein kinase C α . *J Clin Endocrinol Metab* 86:3237–3242.
- Tai CJ, Kang SK, Choi KC, Tzeng CR, Leung PC. 2001b. Adenosine triphosphate activates mitogen-activated protein kinase in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 142:1554–1560.
- Tilly JL, Kowalski KI, Schomberg D, Hsueh AJW. 1992. Apoptosis in atretic ovarian follicles is associated with selective decreases in messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptors and cytochrome P450 aromatase. *Endocrinology* 131:1670–1676.
- Webb RJ, Bains H, Crutwell C, Carroll J. 2002. Gap-junctional communication in mouse cumulus oocyte complexes: Implications for the mechanism of meiotic maturation. *Reproduction* 123:41–52.
- Yacobi K, Wojtowicz A, Tsafirri A, Gross A. 2004. Gonadotropins enhance caspase-3 and -7 activity and apoptosis in the theca-interstitial cells of rat preovulatory follicles in culture. *Endocrinology* 145:1943–1951.
- Yi F-X, Zhang AY, Campbell WB, Zou A-P, Breemen C, Li P-L. 2002. Simultaneous in situ monitoring of intracellular Ca⁺⁺ and NO in endothelium of coronary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H2725–H2732.

Epithelium and/or Theca Are Required for ATP-Elicited K^+ Current in Follicle-Enclosed *Xenopus* Oocytes

CARLOS SALDAÑA, FRANCISCO VÁZQUEZ-CUEVAS, EDITH GARAY, AND ROGELIO O. ARELLANO*

Laboratorio de Neurofisiología Celular, Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología UNAM, México

The *Xenopus* follicular cell membrane is endowed with ATP-sensitive K^+ channels, which are operated by various transmitters. These generate the ionic response named $I_{K,cAMP}$ via a mechanism that involves intracellular cAMP synthesis. It is known that opening these K^+ channels favors oocyte maturation. Follicle stimulation by adenosine (Ado) or ATP consistently generates a strong $I_{K,cAMP}$ via activation of P1 and P3 purinergic receptors; however, ATP can also inhibit $I_{K,cAMP}$, apparently acting on a third receptor type. Here, we show that $I_{K,cAMP}$ might be elicited by ATP released within the follicle, and that current activation by ATP was entirely dependent on the presence of epithelial and/or theca layers. Morphological studies confirmed that removal of epithelium/theca in these follicles (*e.t.r.*) was complete, and activation of fast Cl^- (F_{in}) currents by ATP in *e.t.r.* follicles confirmed that communication between oocyte and follicular cells remained unchanged. Thus, dependence on epithelium/theca was specific for ATP-elicited K^+ current. Using UTP and $\beta\gamma$ -MeATP as specific purinergic agents for $I_{K,cAMP}$ inhibition and activation, respectively, it was found that inhibition of $I_{K,cAMP}$ elicited by ATP or UTP was robustly present in *e.t.r.* follicles but was absent or strongly decreased in whole follicles (*w.f.*). Accordingly, this indicated that in *w.f.*, epithelium and/or theca downregulated the $I_{K,cAMP}$ inhibition evoked by ATP, and that this control mechanism was absent in *e.t.r.* follicles. We suggest that this notable action on follicular cells involves one or both of two mechanisms, a paracrine transmitter released from epithelial and/or theca layers and action of ecto-ATPases. *J. Cell. Physiol.* 202: 814–821, 2005. © 2004 Wiley-Liss, Inc.

In the follicle-enclosed *Xenopus* oocyte, different transmitters activate potassium ion currents by stimulating a variety of receptors located in the follicular cell membrane. All of these specific membrane receptors increase the levels of intracellular cAMP, which in turn operates potassium channels also located in the follicular cell membrane, generating an ionic current named $I_{K,cAMP}$ (Kusano et al., 1977, 1982; Lotan et al., 1982; Miledi and Woodward, 1989a; Arellano et al., 1996). The main type of ionic channel involved has several characteristics in common with ATP-sensitive K^+ channels, including blockage by glibenclamide and other antidiabetic sulfonylureas and activation by K^+ channel openers such as pinacidil and cromakalim (Honoré and Lazdunski, 1991). Although the mechanism is not completely understood, it has been demonstrated that $I_{K,cAMP}$ activation increases both the rate and the efficiency of oocyte maturation evoked by progesterone (Wibrand et al., 1992). This strongly suggests that activation and regulation of $I_{K,cAMP}$ channels are physiological processes that control oocyte maturation. The $I_{K,cAMP}$ agonists known include: catecholaminergic and adrenergic transmitters (Kusano et al., 1977, 1982; Van Renterghem et al., 1985; Miledi and Woodward, 1989a), purinergic substances (Lotan et al., 1982, 1986; Greenfield et al., 1990), and prostaglandins (Miledi and Woodward, 1989b), as well as hormones and various peptides such as follicle stimulating hormone and chorionic gonadotropin (Woodward and Miledi, 1987a), gonadotropin-hormone releasing hormone (Yoshida and Plant, 1991), vasoactive intestinal peptide (Woodward and Miledi, 1987b), atrial natriuretic factor and oxytocin (Miledi and Woodward, 1989b), corticotropin-releasing factor, arginine-vasopressin (Moriarty et al., 1988), the calcitonin gene-related peptide (Guillemare et al., 1994), and others.

Among the various substances that generate $I_{K,cAMP}$, the effects of Ado and ATP have been studied extensively. Ado is known to stimulate specifically purinergic receptors of the P_1 type (Lotan et al., 1982; Greenfield

et al., 1990), but the current is also generated by ATP itself rather than through products of its degradation by ecto-ATPase activity present in the follicle. ATP stimulates the K^+ current via a proposed P_3 type receptor that is equally sensitive to both Ado and ATP (King et al., 1996, 1998; Matsuoka et al., 1998). Thus, purinergic agonists that operate $I_{K,cAMP}$ channels act on receptors distinct from ATP-stimulated receptors that generate in the follicular cells a Cl^- current named F_{in} . This latter response corresponds pharmacologically to activation of $P2Y_2$ -like receptors (Arellano et al., 1998; Perez-Samartin et al., 2000). In addition, the follicular $I_{K,cAMP}$ is inhibited by muscarinic and $P2$ purinergic receptors (Dascal et al., 1985; Van Renterghem et al., 1985; Arellano et al., 1996, 1999; Fujita et al., 2001). Thus, ATP has dual and opposite effects on follicular K^+ currents, promoting both activation and inhibition. The inhibitory mechanism seems to be independent of intracellular Ca^{++} and protein kinase C activation (Dascal et al., 1985; Guillemare et al., 1994) and does not involve uncoupling of follicular cells from the oocyte (Arellano et al., 1999; Fujita et al., 2001).

Recently, it has been demonstrated that the *Xenopus* oocyte can release ATP, both in basal conditions and in response to distinct stimuli such as osmotic changes and mechanical stimulation (Bodas et al., 2000; Maroto and

Contract grant sponsor: UNAM-DGAPA; Contract grant number: IN221902; Contract grant sponsor: CONACyT México; Contract grant number: 40167Q.

*Correspondence to: Rogelio O. Arellano, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 1-1141, Querétaro, Qro., México, C.P. 76001, México. E-mail: arellano@calli.inb.unam.mx

Received 30 April 2004; Accepted 17 June 2004

DOI: 10.1002/jcp.20184

Hamill, 2001; Aleu et al., 2003). It has been suggested that ATP released through these mechanisms has paracrine effects within the follicle, but this hypothesis has not yet been explored in detail. Here, we report two main findings: first, we found that there exists a basal activation of $I_{K,cAMP}$ that appears to be activated by ATP released within the follicle, and second, that the epithelium and/or the theca, which surround the oocyte and its follicular cells, are required for the generation or modulation of this response. Our results support the idea that ATP might act as an intrafollicular signal that modulates oocyte maturation.

MATERIALS AND METHODS

Follicles were manually separated from the ovaries of *Xenopus laevis* obtained from Xenopus I (Ann Arbor, MI). Briefly, ovary lobules were surgically removed under sterile conditions from frogs anesthetized by hypothermia, and were placed in sterile unsupplemented modified Barth's medium (containing, in mM: 88 NaCl, 0.2 KCl, 2.4 NaHCO₃, 0.33 Ca(NO₃)₂, 0.41 CaCl₂, 0.82 MgSO₄, 0.88 KH₂PO₄, 2.7 Na₂HPO₄, pH 7.4, with gentamicin 70 µgml⁻¹). Follicles in stage VI (Dumont, 1972) were separated as whole follicles (*w.f.*) and as epithelium and theca removed (*e.t.r.*) follicles; in the latter preparation the inner ovarian epithelium together with theca were dissected away using sharp forceps. The *w.f.* and *e.t.r.* follicles were incubated (18–20°C) in Petri dishes containing sterile modified Barth's medium supplemented with 5 mM glucose and 0.2% fetal bovine serum until the morphological or electrophysiological recording were performed.

Morphology

For histological examination, isolated follicles were fixed in 0.1 M phosphate buffer containing 4% paraformaldehyde for 16 h, frozen in 2-methylbutane and cut into 10 µm sections. Finally, samples were stained with hematoxylin/eosin and analyzed using conventional light microscopy.

For scanning electron microscopy, follicles were fixed with 3% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer for 2 h at room temperature then washed with buffer and dehydrated with increasing concentrations of ethanol (30–100%). Samples were dried to critical point in a Samdri-780 device and then covered with a fine coat of gold (300 Å) in an Ion Sputter FC 1100 at high vacuum as previously described (Molinari et al., 1998). Samples were analyzed, and micrographs were taken in a Jeol JSM-5410LV scanning microscope.

For transmission electron microscopy, follicles were fixed with 3% glutaraldehyde for 3 h in 10 mM phosphate buffer, 60 mM sucrose, pH 7.2, then placed for 3 h in 2% osmium tetroxide in phosphate buffer (pH 7.2) and finally embedded in fresh Epon resin (Epon 812). After polymerization for 48 h at 60°C, sections (300 Å) were made on a Reichert-Jung Ultracut microtome and were examined in a Jeol 1200 EXII transmission electron microscope.

Electrophysiology

Follicular electrical responses were monitored using a two-electrode voltage clamp (Arellano et al., 1996), continuously superfusing (10 ml/min) the follicles with normal Ringer's (NR) solution (containing, in mM: 115 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 5 HEPES, pH 7.0). Unless otherwise stated, *w.f.* and *e.t.r.* follicles were voltage-clamped at -40 mV, and drugs were applied by superfusion. Current-voltage (I/V) relationships were obtained by changing the membrane potential from +20 to -120 mV in 20 mV steps for 100 msec, and the membrane current obtained for each voltage step was plotted as in Figure 2.

Drugs

Forskolin (FSK) was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA). Tetraethylammonium (TEA⁺) chloride was obtained from Baker (Phillipsburg, NJ). Suramin, βγ-methylene ATP (βγ-MeATP), dATPγS, and all other compounds (collagenase type I, ATP, UTP, ACh, pinacidil, oxotremorine, N^G-Nitro-L-arginine-

methyl ester hydrochloride (L-NAME), hydrogen peroxide, propranolol hydrochloride, SCH23390, atropine, clozapine) were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

RESULTS

Morphology and electrical properties of *w.f.* and *e.t.r.* follicles

The present study was made using two follicular preparations, *w.f.* and *e.t.r.* In order to corroborate the structural changes made by the dissection, a morphological analysis was performed that focused on the different layers of the oocyte envelope. Histological preparations of *e.t.r.* follicles showed elimination of all the conspicuous structures that form blood vessels and the inner ovarian epithelium (Dumont and Brummett, 1978), while the single layer of follicular cells remained attached to the surface of the vitelline layer (Fig. 1A). This was substantiated by electron microscopy (Fig. 1B), which clearly showed complete elimination of the theca and epithelial layers, leaving intact the monolayer of follicular cells and its basal membrane. Scanning electron microscopy indicated that *w.f.* were covered by a smooth cellular surface characteristic of the inner ovarian epithelium, while the *e.t.r.* follicles presented the typical image of interwoven collagen fibers that compose the basal membrane of follicular cells (cf., 5, 27) (Fig. 1C). Thus, *e.t.r.* dissection consistently provided follicles devoid of all layers external to the basal membrane of the follicular cells, eliminating mainly four cell types (following description in Dumont and Brummett, 1978) contained in epithelium and theca, i.e., fibroblast-like cells, blood cells and vessels, and the inner ovarian epithelium itself.

Electrically, *w.f.* (n = 99, 19 frogs) had a mean resting potential (RP) of -44.5 ± 3.5 mV in NR solution, while that for *e.t.r.* follicles (n = 24, 8 frogs) was -31.6 ± 2 mV (all data given as mean ± SEM). In general, the mean input resistances (R_o) were 297.8 ± 47 KΩ and 319 ± 34 KΩ for the *w.f.* and *e.t.r.* follicles, respectively. Consistently, a group of donors (11 frogs) presented *w.f.* (n = 33) that were markedly hyperpolarized (mean RP of -78.4 ± 3.8 mV) with respect to *e.t.r.* follicles from the same frogs; this difference seemed to be due mainly to an outward current activated in basal conditions (Fig. 2A). This current was completely inactivated after 2–4 min of superfusion with NR. Before inactivation the R_o for hyperpolarized *w.f.* (n = 10) was 52.7 ± 3.5 KΩ and after inactivation this increased to 384 ± 83 KΩ (Fig. 2A), while RP after inactivation decreased from -79 ± 7 mV to -34 ± 3.6 mV. The current-voltage relationship before and after inactivation of the basal outward current showed that this inverted at -84.6 ± 3 mV (four follicles, two frogs), and the relationship was linear in the -120 to +20 mV range (insert in Fig. 2A), strongly supporting the idea that the basal current was mainly carried by K⁺ ions. Further support for this interpretation was obtained in follicles that were incubated 10 min in 100 µl of NR containing different drugs before RP and R_o were measured. As shown in Figure 2B, hyperpolarization was reduced in the presence of Ba⁺⁺ (1 mM), a nonspecific K⁺ channel blocker, or glibenclamide (100 µM), a blocker of ATP-sensitive K⁺ channels responsible for $I_{K,cAMP}$ generation in *Xenopus* follicles. In all cases, reduction in RP was associated with an increase in R_o . Decreases by these blockers and the linear I/V relationship suggest participation of ATP-sensitive K⁺ channels in *w.f.* basal hyperpolarization. A RP decrease and corresponding R_o increase were also observed in *w.f.* incubated in NR containing 500 µM

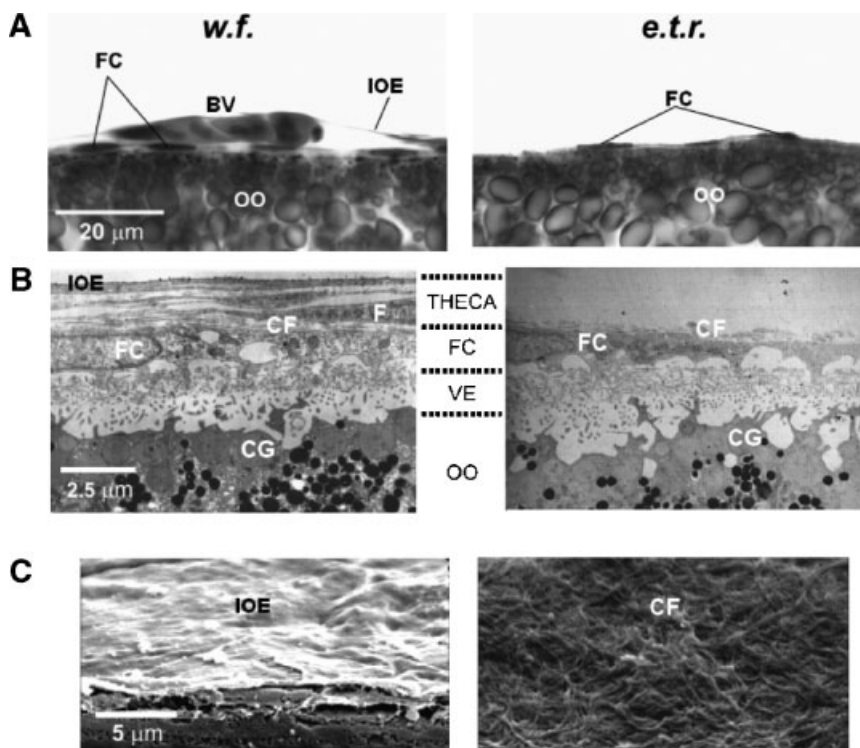


Fig. 1. Morphological characteristics of whole follicles (*w.f.*) and epithelium/theca removed (*e.t.r.*) follicles. **A:** Example of a histological section stained with hematoxylin/eosin. **B:** Electron microscopy of representative thin sections. **C:** Scanning electron microscopy of the follicle surface. A and B illustrate that tissues external to the follicular cell (FC) layer were completely removed in *e.t.r.* samples. B and C

show that the fibrous FC basal membrane composed of collagen (CF) was maintained intact in *e.t.r.* follicles; contrast with the *w.f.* smooth surface characteristic of the inner ovarian epithelium (IOE). Abbreviations: BV, blood vessels and cells; VE, vitelline envelope; OO, oocyte; F, fibroblasts; CG, cortical granule.

suramin, an antagonist of purinergic receptors, again suggesting that ATP receptors and activation of $I_{K,CAMP}$ were involved in maintaining the *w.f.* basal hyperpolarization. Indeed, the group of *w.f.* that exhibited basal hyperpolarization correlated well with follicles highly responsive to ATP (see below). Thus, it was of interest to know how elimination of epithelium and theca would affect the potassium current generated by purinergic agents.

Ionic current responses in *w.f.* and *e.t.r.* follicles

Extracellular application of Ado or ATP (1–100 μ M) generated outward currents in *w.f.* In addition, exclu-

sively ATP elicited a fast inward current, which, in full agreement with previous studies, corresponded to the current named F_{in} (Arellano and Miledi, 1993; Arellano et al., 1996, 1998). When outward currents generated by Ado or ATP in the same *w.f.* were compared, their amplitudes were frequently independent (Fig. 3A,B). Follicles from 50% of the donors (from a total of 19) had follicles with current responses to Ado that were >10% larger than ATP-induced currents, follicles from 20% of the donors had more robust responses to ATP (also >10% larger), and in *w.f.* from 30% of the donors the outward current amplitudes were similar for both agonists (Fig. 3A). In this same group there were donors

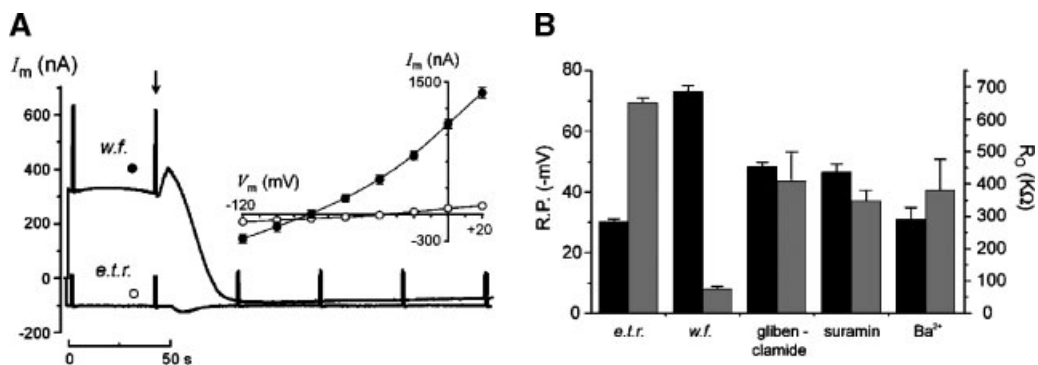


Fig. 2. Basal outward current in *w.f.* **A:** Follicles, *w.f.* and *e.t.r.* from the same donor, were voltage-clamped at time zero (in this and following traces, the potential was held at -40 mV, and voltage steps of 20 mV (1.5 sec) were applied periodically to monitor membrane conductance). The superfusion (arrow) with NR (10 ml/min) washed out a basal outward current in *w.f.* In approximately 50 sec, and this event was associated with a decrease of membrane conductance.

Similar results were obtained in follicles of 11 frogs from a total of 19. The insert shows the current/voltage relationship for the basal outward current in *w.f.* (●; $n = 4$, two frogs) and the current observed in *e.t.r.* follicles (○; $n = 5$, two frogs). **B:** Mean RP (black bars) and R_o (gray bars) of follicles (2–3 follicles each column) treated 10 min in NR containing 100 μ M glibenclamide, 500 μ M suramin, or 1 mM Ba²⁺.

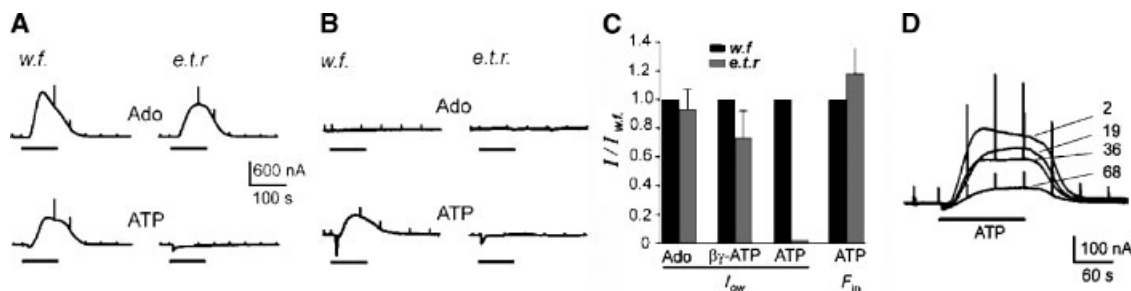


Fig. 3. Effect produced by elimination of epithelium and theca on the follicular responses elicited by Ado or ATP (100 μ M). **A** and **B** illustrate examples of follicular responses in two different frogs. Each part shows the current responses generated in *w.f.* (left column) and *e.t.r.* follicles (right column). In this and the following figures, gray areas and bars indicate drug application time. Note that dissection in *e.t.r.* follicles eliminated totally and specifically the outward current elicited by ATP, while the F_{in} current evoked by ATP and the K^+ current evoked by Ado remained unaltered. From a total of 19, the

(10%) with follicles in which ATP-responses were present (Fig. 3B), while Ado completely failed to activate responses. However, in all cases (34 *e.t.r.* follicles from 10 frogs), removal of theca and epithelium eliminated completely the outward currents elicited specifically by ATP, while in most cases this did not affect either the outward current activated by Ado or the F_{in} current activated by ATP (Fig. 3C). This prominent effect was observed soon after dissection, since follicles ($n=6$) monitored within 2–5 min after epithelium/theca elimination already showed no ATP-elicited outward current. Moreover, the effect was dependent on the area dissected, as follicles with epithelium/theca removed only from the vegetable or animal pole gave ATP-elicited responses with amplitudes about 50% of those observed in *w.f.* For example, *w.f.* ($n=4$) from one frog had amplitudes of outward responses of 121 ± 48 nA and $1,220 \pm 370$ nA elicited by 10 μ M Ado and ATP, respectively, while partial-*e.t.r.* follicles ($n=3$) from the same donor had currents of 160 ± 53 nA and 496 ± 92 nA for Ado and ATP. Similar results were obtained in follicles from two more frogs. Commonly, $I_{K,cAMP}$ elicited in *w.f.* by ATP (10–100 μ M) desensitized strongly with successive stimulations, even when washing periods of 15–30 min were applied. For example, a group of 13 *w.f.* (3 frogs) that were tested twice for 100 μ M ATP with washing periods of 15–25 min showed an average peak amplitude in the second application of $61 \pm 17\%$ with respect to the first one. In several *w.f.* (four follicles from seven tested) $I_{K,cAMP}$ continued to decrease in successive ATP applications over extended periods (>1 h) of recording (Fig. 3D). During the same period, F_{in} chloride currents elicited by ATP did not decrease, i.e., for the same *w.f.* that were tested twice, the second application of ATP generated F_{in} currents that were $145 \pm 18\%$ compared to the first one.

Finally, it also was observed that the group of donors with hyperpolarized *w.f.* (RP > -75 mV, Fig. 2) presented the highest average amplitude for the outward current elicited by either Ado or ATP (100 μ M); thus hyperpolarized *w.f.* ($n=12$) from three frogs had average currents of $1,125 \pm 346$ nA or 947 ± 278 nA, respectively, while *w.f.* ($n=9$) with RP within the range of -40 to -45 mV had average currents of 325 ± 191 nA and 251 ± 168 nA when elicited by Ado or ATP. Together, these results demonstrated that epithelial/theca enveloping layers participate in the mechanism by which ATP activates or modulates outward currents.

pattern shown in **A** was obtained in follicles of 6 donors, while that in **B** was observed in 2 frogs. **C**: Bars indicate the normalized amplitude of outward currents (I_{ow}) elicited by Ado, $\beta\gamma$ -MeATP or ATP in *e.t.r.* follicles (gray bars) compared with the corresponding amplitude in *w.f.* (black bars) from the same donor (4–5 follicles in each bar from three frogs). The F_{in} currents elicited by ATP in the same follicles are also shown. **D**: Successive ATP (100 μ M) applications in a *w.f.*; numbers indicate the time in min, since superfusion started.

$I_{K,cAMP}$ activated by ATP in *w.f.*

Outward currents elicited in follicles and oocytes by adrenergic and catecholaminergic drugs were studied originally by Kusano et al. (1977, 1982), and those activated by purinergic agonists were described by Lotan et al. (1982, 1986). These and later reports have shown that all these responses correspond to K^+ currents that actually arise in the membrane of the follicular cells and have the characteristics of the current named $I_{K,cAMP}$ (e.g., Stinnakre and Van Renterghem, 1986; Woodward and Miledi, 1987a; Miledi and Woodward, 1989a; Greenfield et al., 1990; Honoré and Lazdunski, 1991; King et al., 1996). The ATP-elicited outward current dependent on the presence of epithelium/theca had a similar $I_{K,cAMP}$ time-course. However, since Ado responses were expressed independently in follicles from different donors and were not affected by epithelium/theca removal, the ATP receptor involved seemed to be different from the P3 receptor type previously considered mainly responsible for $I_{K,cAMP}$ activation by ATP (King et al., 1996, 1998). Thus, it was necessary to confirm that outward currents stimulated by ATP in *w.f.* were the same as $I_{K,cAMP}$. As shown in Figure 4, the characteristics of the outward current in *w.f.* were consistent with the activation of $I_{K,cAMP}$: (1) ATP-elicited outward currents had a reversal potential of -95.2 ± 3.5 mV (4 *w.f.*, 2 frogs), and they were blocked by extracellular 1 mM Ba^{++} and 10 mM TEA^+ (not shown), (2) ATP-elicited currents were enhanced by $152 \pm 4\%$ in the presence of 0.5 μ M FSK (7 *w.f.*, 3 frogs; Fig. 4B), which elicited no response when applied alone at the same concentration, (3) the current varied linearly with the membrane potential, in a way similar to that observed for $I_{K,cAMP}$ generated by different drugs (Arellano et al., 1996), (4) ATP-evoked currents were potently (80–95%) inhibited in *w.f.* ($n=7$, 3 frogs) bathed in 1 μ M ACh or 100 μ M oxotremorine, the same effect that these drugs produced on $I_{K,cAMP}$ (Dascal et al., 1985; Van Renterghem et al., 1985; Arellano et al., 1999), (5) outward currents elicited by 100 μ M ATP were $82 \pm 4\%$ inhibited by 100 μ M glibenclamide (4 *w.f.*, 2 frogs), a blocker of ATP-sensitive K^+ channels involved in $I_{K,cAMP}$ generation, while pinacidil (100 μ M), a K^+ channel opener that was ineffective when applied alone, enhanced the currents by $153 \pm 11\%$ when coapplied with ATP (3 *w.f.*, 2 frogs) (Honoré and Lazdunski, 1991), and (6) it was also confirmed that the outward current

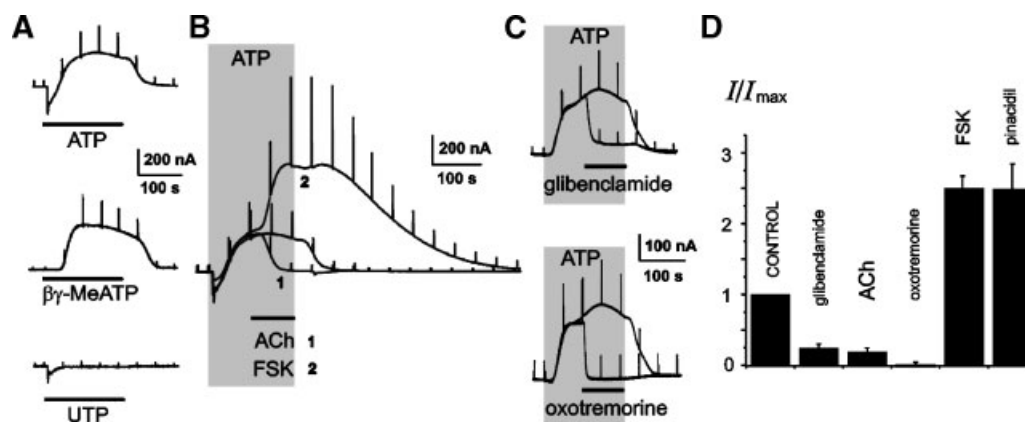


Fig. 4. Identity of the ATP-elicited outward current that depends on the presence of epithelium/theca layers. The electrical and pharmacological characteristics of outward currents elicited by ATP in *w.f.* corresponded to those previously reported for $I_{K,cAMP}$: (A) outward currents were induced by ATP and $\beta\gamma$ -MeATP but not by UTP (100 μ M all drugs), (B) superimposed traces show that outward

currents elicited by 100 μ M ATP (gray area) were potentiated by FSK (0.5 μ M) and inhibited by ACh (1 μ M), (C) glibenclamide (100 μ M) and oxotremorine (100 μ M), drugs that act specifically on $I_{K,cAMP}$, potently inhibited the ATP-elicited (100 μ M) response. D: Effect of different drugs on the amplitude of $I_{K,cAMP}$ elicited by ATP (control) obtained in 4–7 *w.f.* in experiments similar to those in B and C.

was mimicked by $\beta\gamma$ -MeATP (10–50 μ M) but not by UTP (1–100 μ M), and (7) 500 μ M suramin, a non-specific antagonist of purinergic receptors, decreased the (100 μ M) ATP-elicited outward current by $34 \pm 3\%$ (4 *w.f.*, 2 frogs) (King et al., 1996, 1998). Thus, the outward current stimulated by ATP in *w.f.* clearly corresponded to activation of $I_{K,cAMP}$ channels.

Nature of the influence of epithelial/theca layer on $I_{K,cAMP}$ generation by ATP

All together, these results constitute strong evidence that the epithelial/theca layer influences the opening of $I_{K,cAMP}$ channels by ATP in follicular cells. As mentioned above, it has been demonstrated that ATP has dual effects on $I_{K,cAMP}$, activating the channels but also causing their inhibition. Therefore, it is possible that ATP acted indirectly through a transmitter originating in epithelium/theca cells. In fact, the follicular cell membrane is known to have several specific receptors for diverse substances, all of them coupled to cAMP synthesis (Arellano et al., 1996), and the release of any of these agents from the epithelial/theca layer might be triggered by ATP. To explore this possibility we applied blockers of several of the main transmitters described (2–3 *w.f.* for each drug), and we found that the response to 100 μ M ATP was not altered by the action of antagonists such as atropine, propranolol, SCH23390, or clozapine (all at 25 μ M), which act on muscarinic, adrenergic, dopaminergic, and serotonergic receptors, respectively. Also, $I_{K,cAMP}$ was not affected when follicles were incubated overnight with 10 μ M L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor, or by application of 5 mM H_2O_2 . Although the list of antagonists and other possible transmitters tested is clearly not comprehensive, the fact that $\beta\gamma$ -MeATP (see below) evoked strong $I_{K,cAMP}$ in *e.t.r.* follicles indicated that these follicles had the necessary molecular elements to generate directly the response via purinergic stimulation; thus, there is no need to postulate a second transmitter with origin in epithelium/theca.

Activation of $I_{K,cAMP}$ in *w.f.* might be explained by a strong down-regulation of the inhibitory mechanism. In order to evaluate this suggestion, experiments were conducted stimulating specifically either the activation or the inhibition of $I_{K,cAMP}$ channels via purinergic agonists in both *w.f.* and *e.t.r.* follicles. Previous studies

have established that $I_{K,cAMP}$ is elicited by $\beta\gamma$ -MeATP but not by UTP (King et al., 1996; Figs. 4 and 5). We found that UTP (10–100 μ M) was a powerful agonist of the inhibitory mechanism, while $\beta\gamma$ -MeATP (10–50 μ M) was ineffective. The effect of these drugs was examined on *w.f.* ($n = 23$) and *e.t.r.* follicles ($n = 15$) from seven different frogs. The experiments were made by testing the effect of these two drugs on the activation of $I_{K,cAMP}$ by Ado or ATP. As shown in Figure 5A, in *e.t.r.* follicles UTP (10 μ M) blocked the ability of Ado to activate $I_{K,cAMP}$. However, UTP applied to *w.f.* from the same donor did not reduce $I_{K,cAMP}$ induced by Ado (100 μ M). The same results were obtained applying 100 μ M UTP, or using ATP (100 μ M) to activate $I_{K,cAMP}$ (data not shown). In addition, in both *w.f.* and *e.t.r.* follicles, UTP alone did activate F_{in} currents but did not generate $I_{K,cAMP}$, results that were confirmed in follicles of five frogs. In seven *w.f.* from two other frogs, however, UTP (100 μ M) inhibited $I_{K,cAMP}$ by $48 \pm 15\%$ when $I_{K,cAMP}$ was elicited by either Ado or ATP, which indicated that UTP inhibitory potency varied among *w.f.* from different frogs. Finally, $I_{K,cAMP}$ was elicited by $\beta\gamma$ -MeATP in both *w.f.* and *e.t.r.* follicles and did not affect $I_{K,cAMP}$ that were subsequently generated by Ado (Fig. 5A) or ATP. Nevertheless, in *e.t.r.* follicles from four frogs, the mean amplitude of $I_{K,cAMP}$ generated via $\beta\gamma$ -MeATP was consistently $45 \pm 21\%$ less than that generated in *w.f.* from the same donors (not shown).

The absence of purinergic inhibition of $I_{K,cAMP}$ in *w.f.* was also demonstrated by applying ATP at the peak of the current elicited by Ado. This is shown in Figure 5B, where the traces illustrate currents recorded in *w.f.* and *e.t.r.* follicles in three conditions, Ado or ATP alone, and coapplication of Ado plus ATP (both at 10 μ M). The top and middle superimposed traces show current responses in *w.f.* and *e.t.r.* follicles, respectively, elicited by Ado alone and adding ATP at the peak of $I_{K,cAMP}$ elicited by a preceding superfusion of Ado alone. The bottom traces show the current responses elicited by ATP alone in the corresponding *w.f.* and *e.t.r.* follicle. It is apparent that in *e.t.r.* follicles, but not in *w.f.*, ATP completely inhibited $I_{K,cAMP}$; similar results were obtained in seven other follicles from three different frogs.

One simple explanation for the absence of inhibition in most *w.f.* is that the epithelium/theca constituted a

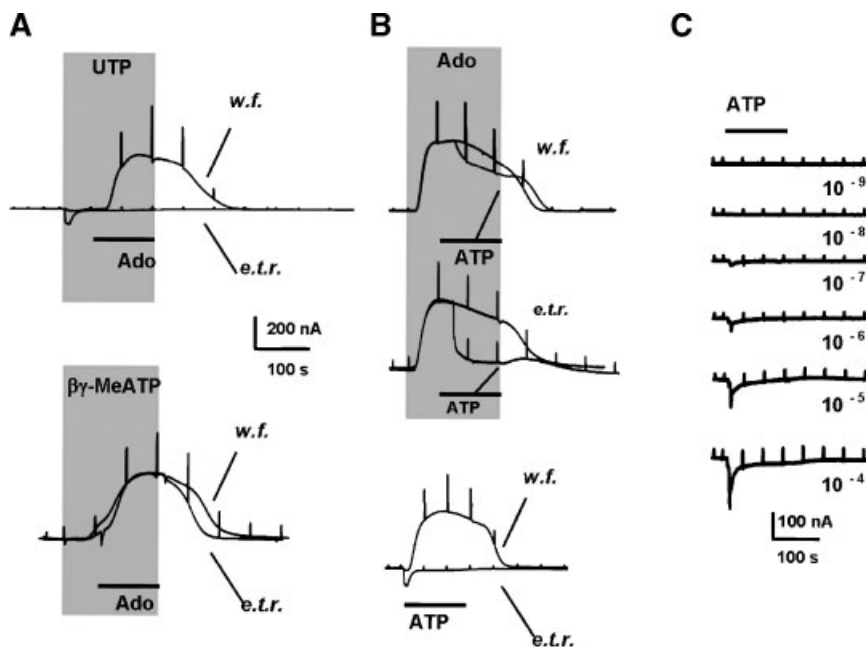


Fig. 5. Downregulation of $I_{K,cAMP}$ inhibition elicited by UTP or ATP in *w.f.* A: Superimposed traces show that in *e.t.r.* follicles, 10 μ M UTP blocked the ability of 100 μ M Ado to generate $I_{K,cAMP}$, while in *w.f.* this effect was usually decreased or absent. The activation agonist $\beta\gamma$ -MeATP (100 μ M) did not affect the generation of $I_{K,cAMP}$ by 100 μ M Ado either in *w.f.* or *e.t.r.* follicles. B: Superimposed traces show two

examples of the $I_{K,cAMP}$ elicited by 10 μ M Ado alone, and coapplication of 10 μ M ATP at the top of the Ado elicited response, in both *w.f.* and *e.t.r.* follicles from the same donor. Also illustrated (bottom traces) are the responses of both types of follicles to 10 μ M ATP alone. C: Membrane currents elicited by 1 nM–100 μ M ATP in an *e.t.r.* follicle.

diffusion barrier for ATP such that the limited amount of ATP near the follicular cell membrane mainly activated but did not inhibit the $I_{K,cAMP}$ channels. This hypothesis implies that the ATP concentration necessary for activation is lower than that for inhibition. ATP dose-response curves made using *e.t.r.* follicles argued against this possibility, as shown in Figure 5C. At concentrations ranging from 1 nM to 100 μ M, ATP was unable to elicit $I_{K,cAMP}$ in the *e.t.r.* follicles (seven follicles, three donors), whereas the *w.f.* ($n=3$) from the same donor showed $I_{K,cAMP}$ (100 μ M ATP) with an average amplitude of 743 ± 125 nA. These results strongly suggest that the main effect of the epithelial/theca layers was a strong downregulation of the $I_{K,cAMP}$ inhibitory mechanism elicited by purinergic agonists.

DISCUSSION

The results described clearly showed that epithelium and/or theca are necessary for the activation of $I_{K,cAMP}$ both in basal conditions and when stimulated by ATP in *Xenopus* follicles. ATP-elicited outward currents were identified as $I_{K,cAMP}$ by showing that, as for cAMP activated K^+ currents, the ATP responses were also amplified by pinacidil and FSK and were inhibited by glibenclamide and muscarinic agents. The nature and localization of the ATP receptor involved probably correspond to those suggested previously (King et al., 1996; Matsuoka et al., 1998). Thus, it seems that P3 type receptors, which are sensitive to Ado, ATP, and $\beta\gamma$ -MeATP and are located in the follicular cell membrane, are responsible for $I_{K,cAMP}$ generation.

Based on the dual effects of ATP on $I_{K,cAMP}$, its activation and inhibition, several hypotheses might be envisioned to explain the dependency of the current on epithelium/theca. For example, an indirect action of ATP on the $I_{K,cAMP}$ activation mechanism is clearly a possibility, and two main hypotheses in this sense are: (1) It is possible that ecto-ATPases located in the

epithelial/theca compartment degraded ATP to adenosine, and that this activity was absent in *e.t.r.* follicles. Thus, in *w.f.*, application of ATP activated $I_{K,cAMP}$ indirectly through adenosine, which stimulated P1 type receptors. Results of two previous independent studies (King et al., 1996; Matsuoka et al., 2002) argue against a significant contribution of this mechanism. They indicate that the low concentration of adenosine generated from ATP by ecto-ATPases in follicles and oocytes does not account for the effect observed, strongly suggesting that ATP acts directly to evoke $I_{K,cAMP}$. Furthermore, in both studies, products of ecto-ATPase activity were measured in the bulk solution, and it has been pointed out that the adenosine concentration in solution might be less than that at the membrane level (Matsuoka et al., 2002). If this is the case, the ecto-ATPase activity of interest would be that displayed by the follicular cell and oocyte membranes, both of which are intact in the *e.t.r.* preparation, thus in these follicles the enzyme activity would be similar to that in *w.f.* Some other observations cannot be fully explained by the ecto-ATPase action hypothesis. These include the potent agonistic effect of the ATPase-resistant drug $\beta\gamma$ -MeATP, the persistence of the F_{in} current elicited by ATP in *w.f.*, and importantly, the existence shown here of donors which present follicles with strong $I_{K,cAMP}$ responses to ATP but not to adenosine (see Fig. 3B). (2) A second possibility is that stimulation of ATP receptors in the epithelial/theca layers released a transmitter that diffused to follicular cells where it stimulated cAMP synthesis. It is well known that a variety of specific receptors coupled to adenylate cyclase are present in the membrane of follicular cells (Arellano et al., 1996), and each of them is a candidate to be stimulated by an ATP-released paracrine transmitter. Here, we have pharmacologically eliminated several compounds shown to be paracrine transmitters in different cell systems including dopamine, noradrenaline, acetylcholine, nitric oxide

and H_2O_2 (e.g., Chen et al., 2000; Avshalumov et al., 2003). One observation that argues directly against the requirement of ATP-elicited release of any agonist is the persistence of the purinergic activation mechanism in *e.t.r.* follicles, evidence for this is the ability of $\beta\gamma$ -MeATP to evoke a $I_{K,cAMP}$. This result demonstrates that *e.t.r.* follicles (i.e., the follicular cell membrane) have the complete purinergic membrane machinery to generate $I_{K,cAMP}$.

The possibilities discussed above are not all-inclusive, and an ancillary involvement of activation through some of these mechanisms cannot now be discarded. However, we showed here that the principal and most potent effect provoked by the epithelium/theca layers was downregulation of $I_{K,cAMP}$ inhibition. This was demonstrated in experiments where UTP, a specific agent for $I_{K,cAMP}$ inhibition, acted mainly in the absence of the superficial layers. Application of ATP in *e.t.r.* follicles seemed to generate both activation and inhibition of $I_{K,cAMP}$, but the latter effect was so strong and rapid that it eliminated channel opening and resulted in null current. In a way similar to that discussed above in the activation hypothesis, downregulation of the inhibition mechanism in *w.f.* might be explained by two possible actions of the epithelial/theca layer: (1) ecto-ATPases in the external layers degraded ATP, eliminating the inhibition mechanism. The same counter arguments apply here: the rate of ATP breakdown is too low to explain the complete abolition of the inhibition response, especially at high ATP concentrations of $100\ \mu\text{M}$ – $1\ \text{mM}$. In fact, the F_{in} response was present in *w.f.*, clearly indicating that a significant amount of ATP reached the follicular cell membrane. Moreover, action of ecto-ATPases cannot explain how UTP inhibition is completely abolished in *w.f.*, even when follicles were tested with high concentrations ($100\ \mu\text{M}$) of this drug. It has also been shown that ecto-ATPase activity in follicles is strongly inhibited by $100\ \mu\text{M}$ suramin (Ziganshin et al., 1995), but even $500\ \mu\text{M}$ suramin did not eliminate $I_{K,cAMP}$ generated by ATP. (2) A second possible mechanism is that downregulation of $I_{K,cAMP}$ inhibition was effected by a paracrine transmitter released from the epithelial/theca compartment. Some indirect evidence supported the occurrence of such a process in *w.f.* For example, the strong desensitization which occurred on $I_{K,cAMP}$ elicited by repetitive applications of ATP, while F_{in} current amplitude remained constant, might be explained at least in part by a paracrine factor within the *w.f.* being washed out during continuous superfusion. Similarly we found that the effect produced in *e.t.r.* follicles was immediate upon dissection and irreversible. Importantly, the magnitude of the effect was proportional to the epithelial/theca area removed, suggesting that these layers act only on the adjacent follicular cells.

Paracrine pathways within the follicle of different species are fundamental mechanisms involved in physiological aspects of the complex folliculogenesis phenomenon, such as cellular differentiation, growth, and control of gamete maturation (Buccione et al., 1990; Albertini et al., 2001; Johnson, 2003). In mammalian ovarian follicles various paracrine systems have been described that involve not only communication between granulosa cells and oocytes but also participation of theca cells (Tajima et al., 2002). In follicles of several species, chemical communication among the distinct follicular cell types is known to be fundamental for the growth and maturation of the gamete. The transmitter signals identified include several peptides and steroids as well as classical neurotransmitters such

as acetylcholine and dopamine (Mayerhofer et al., 1997, 1998; Fritz et al., 2001).

In *Xenopus* follicles paracrine and autocrine mechanisms have not been sufficiently studied, although there are some well known examples. One is the action of gonadotropins on follicular cells that induces oocyte maturation via a paracrine pathway involving release of progesterone, which ultimately acts on specific receptors located in the oocyte membrane (Smith et al., 1968; Wasserman and Masui, 1974; Masui, 2001). Also, using different methodologies (Bodas et al., 2000; Maroto and Hamill, 2001; Aleu et al., 2003) it has been shown recently that ATP is released, both in basal and stimulated conditions, from the *Xenopus* oocyte. Here, a paracrine action for ATP release was strongly suggested by the subset of *w.f.* that presented, compared to *e.t.r.* follicles from the same donor, a strong basal hyperpolarization that was washed out in a few seconds by simple superfusion with NR. The characteristics of this current, specifically its linear I/V relationship, its sensitivity to glibenclamide and suramin, as well as its correlation with the amplitude of ATP-elicited $I_{K,cAMP}$, strongly suggested that similar ATP-sensitive K^+ channels were involved in both signals. Thus, it seems possible that ATP released in basal conditions from the oocyte, stimulated receptors in the membrane of the follicular cells, opening $I_{K,cAMP}$ channels. This process was controlled by the epithelium/theca which downregulated, via an unknown mechanism, ATP inhibition of $I_{K,cAMP}$ (see Fig. 6). Our results clearly indicated that paracrine signaling within the *Xenopus* follicle controls the level of $I_{K,cAMP}$ activation by ATP in the follicular cell membrane. This epithelium/theca modulation of $I_{K,cAMP}$ is of potential importance since activation of this current increases both the rate and efficiency of oocyte maturation elicited by progesterone (Wibrand et al., 1992). Paracrine signaling might function in the *w.f.* as a purinergic regulatory loop that coordinates the onset and progress of the oocyte maturation process among the different cell types that form the follicle.

This study confirmed and presented detailed information about the purinergic receptor types expressed in the *Xenopus* follicle. It is clear that P1 and P3 receptors located in the follicular cell membrane are responsible

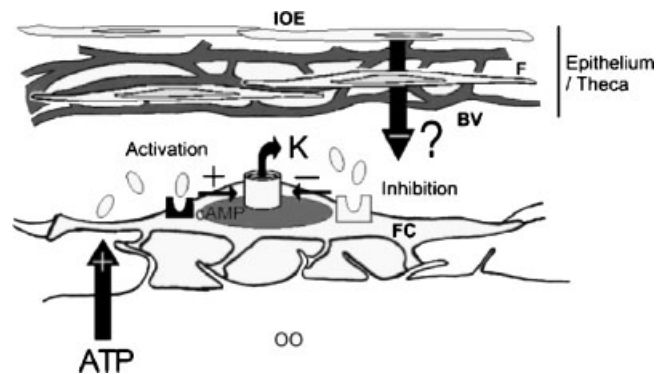


Fig. 6. Scheme that summarizes the two principal effects of ATP on K^+ channels located in follicular cells, activation and inhibition, both mediated through specific receptors also located on these cells. These effects seemed to be affected by two main intrafollicular modulatory pathways, one positive pathway (left + arrow) triggered by the release of ATP (44–46), and one negative pathway (right – arrow) which, as shown here, originates in the epithelial/theca layers. The specific mechanism involved in the negative pathway remains to be determined, but paracrine action and/or ecto-ATPase activity are strong possibilities. Abbreviations as in Figure 1.

for $I_{K,cAMP}$ activation via Ado and ATP, while P2Y₂-like receptors are involved in the activation of F_{in} currents and most probably are also responsible for $I_{K,cAMP}$ inhibition, given that UTP is a full agonist for both responses. Further studies will be necessary to completely elucidate the nature of the influence of the epithelium/theca on ATP-dependent inhibition and generation of $I_{K,cAMP}$, as well as to fully evaluate the relative contribution of paracrine signals and/or ecto-ATPases, the two main factors that might participate in regulating the activation and inhibition of $I_{K,cAMP}$ channels.

ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to Dr. Dorothy D. Pless for help with the manuscript, and to Jorge Sepulveda from the Microscopy Unit at the Instituto de Fisiología Celular, UNAM. We also thank Mr. Horacio Ramírez Leyva, Lic. María del Pilar Galarza Barrios, M.V.Z. Martín García Servín, M. en C. Alberto Lara Ruvalcaba, and to I.S.C. Omar González Hernández. This study was supported by grant from TWAS to R.O. Arellano. F. Vázquez-Cuevas was supported by CONACyT México (No. 129597).

LITERATURE CITED

- Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ. 2001. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* 121:647–653.
- Aleu J, Martin-Satue M, Navarro P, Perez de Lara I, Bahima L, Marsal J, Solsona C. 2003. Release of ATP induced by hypertonic solutions in *Xenopus* oocytes. *J Physiol (London)* 547:209–219.
- Arellano RO, Miledi R. 1993. Novel Cl⁻ currents elicited by follicle stimulating hormone and acetylcholine in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* 102:833–857.
- Arellano RO, Woodward RM, Miledi R. 1996. Ion channels and membrane receptors in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. In: Narahashi T, editor. *Ion channels* 4. New York: Plenum Press.
- Arellano RO, Garay E, Miledi R. 1998. Cl⁻ currents activated via purinergic receptors in *Xenopus* follicles. *Am J Physiol Cell Physiol* 274:C333–C340.
- Arellano RO, Garay E, Miledi R. 1999. Muscarinic receptor heterogeneity in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *J Physiol (London)* 521:409–419.
- Avshalomov MV, Chen BT, Marshall SP, Pena DM, Rice ME. 2003. Glutamate dependent inhibition of dopamine release in striatum is mediated by a new diffusible messenger, H₂O₂. *J Neurosci* 23:2744–2750.
- Bodas E, Aleu J, Pujol G, Martin-Satue M, Marsal J, Solsona C. 2000. ATP crossing the cell plasma membrane generates an ionic current in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 275:20268–20273.
- Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ. 1990. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod* 43:543–547.
- Chen L, Maruyama D, Sugiyama M, Sakai T, Mogi C, Kato M, Kurotani R, Shirasawa N, Takaki A, Renner U, Kato Y, Inoue K. 2000. Cytological characterization of a pituitary folliculo-stellate-like cell line, Tpit/F1, with special reference to adenosine triphosphate mediated neuronal nitric oxide synthase expression and nitric oxide secretion. *Endocrinology* 141:3603–3610.
- Dascal N, Lotan I, Gillo B, Lester HA, Lass Y. 1985. Acetylcholine and phorbol esters inhibit potassium currents evoked by adenosine and cAMP in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:6001–6005.
- Dumont JN. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 136:153–179.
- Dumont JN, Brummett AR. 1978. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). V. Relationships between developing oocytes and their investing follicular tissues. *J Morphol* 155:73–97.
- Fritz S, Wessler I, Breitling R, Rossmannith W, Ojeda SR, Dissen GA, Amsterdam A, Mayerhofer A. 2001. Expression of muscarinic receptor types in the primate ovary and evidence for nonneuronal acetylcholine synthesis. *J Clin Endocrinol Metab* 86:349–354.
- Fujita R, Kimura S, Kawasaki S, Takashima K, Matsumoto M, Hirano H, Sasaki K. 2001. ATP suppresses the K⁺ current responses to FSH and adenosine in the follicular cells of *Xenopus* oocyte. *Jpn J Physiol* 51:491–500.
- Greenfield LJ, Jr., Hackett JF, Linden J. 1990. *Xenopus* oocyte K⁺ current. II. Adenyl cyclase-linked receptors on follicle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 259:C784–C791.
- Guillemare E, Lazdunski M, Honoré E. 1994. CGRP-induced activation of K_{ATP} channels in follicular *Xenopus* oocytes. *Pflügers Arch* 428:604–609.
- Honoré E, Lazdunski M. 1991. Hormone-regulated K⁺ channels in follicle-enclosed oocytes are activated by vasorelaxing K⁺ channel openers and blocked by antidiabetic sulfonylureas. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:5438–5442.
- Johnson AL. 2003. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. *Anim Reprod Sci* 78:185–201.
- King BF, Pintor J, Wang S, Ziganshin AU, Ziganshina LE, Burnstock G. 1996. A novel P1 purinoceptor activates an outward K⁺ current in follicular oocytes of *Xenopus laevis*. *J Pharmacol Exp Ther* 276:93–100.
- King BF, Wildman SS, Townsend-Nicholson A, Burnstock G. 1998. Antagonism of an adenosine/ATP receptor in follicular *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 285:1005–1011.
- Kusano K, Miledi R, Stinnakre J. 1977. Acetylcholine receptors in the oocyte membrane. *Nature* 270:739–741.
- Kusano K, Miledi R, Stinnakre J. 1982. Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus* oocyte membrane. *J Physiol (London)* 328:143–170.
- Lotan I, Dascal N, Cohen S, Lass Y. 1982. Adenosine-induced slow ionic currents in the *Xenopus* oocyte. *Nature* 298:572–574.
- Lotan I, Dascal N, Cohen S, Lass Y. 1986. ATP-evoked membrane responses in *Xenopus* oocytes. *Pflügers Arch* 406:158–162.
- Maroto R, Hamill OP. 2001. Brefeldin A block of integrin-dependent mechanosensitive ATP release from *Xenopus* oocytes reveals a novel mechanism of mechanotransduction. *Biol Chem* 276:23867–23872.
- Masui Y. 2001. From oocyte maturation to the in vitro cell cycle: The history of discoveries of maturation-promoting factor (MPF) and cytoskeletal factor (CSF). *Differentiation* 69:1–17.
- Matsuoka T, Nishizaki T, Nomura T, Mori M, Okada Y. 1998. ATP produces potassium currents via P3 purinoceptor in the follicle cell layer of *Xenopus* oocytes. *Neurosci Lett* 248:130–132.
- Matsuoka I, Ohkubo S, Kimura J, Uezono Y. 2002. Adenine nucleotide-induced activation of adenosine A2B receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes: Involvement of a rapid and localized adenosine formation by ectonucleotidases. *Mol Pharmacol* 3:606–613.
- Mayerhofer A, Dissen GA, Costa ME, Ojeda SR. 1997. A role for neurotransmitters in early follicular development: Induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* 138:3320–3329.
- 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.
- Miledi R, Woodward RM. 1989a. Effect of defolliculation on membrane responses of *Xenopus* oocytes. *J Physiol (London)* 416:601–621.
- Miledi R, Woodward RM. 1989b. Membrane currents elicited by prostaglandins, atrial natriuretic factor and oxytocin in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *J Physiol (London)* 416:623–643.
- Molinari JL, Tato P, Rodriguez D, Solano S, Rubio M, Sepulveda J. 1998. Impairment of the inflammatory reaction on implanted *Taenia solium* metacystodes in mice by a *T. solium* RNA-peptide: A scanning electron microscopy study. *Parasitol Res* 84:173–180.
- Moriarty TM, Gillo B, Sealton S, Landau EM. 1988. Activation of ionic currents in *Xenopus* oocytes by corticotropin-releasing peptides. *Brain Res* 464:201–205.
- Perez-Samartin AL, Miledi R, Arellano RO. 2000. Activation of volume-regulated Cl⁻ channels by ACh and ATP in *Xenopus* follicles. *J Physiol (London)* 525:721–734.
- Smith LD, Ecker RE, Subtelyny S. 1968. In vitro induction of physiological maturation in *Rana pipiens* oocytes removed from their ovarian follicles. *Dev Biol* 17:627–643.
- Stinnakre J, Van Renterghem C. 1986. Cyclic adenosine monophosphate, calcium, acetylcholine and the current induced by adenosine in the *Xenopus* oocyte. *J Physiol (London)* 374:551–569.
- Tajima K, Orisaka M, Hosokawa K, Amsterdam A, Kotsuji F. 2002. Effects of ovarian theca cells on apoptosis and proliferation of granulosa cells: Changes during bovine follicular maturation. *Biol Reprod* 66:1635–1639.
- Van Renterghem C, Penit-Soria J, Stinnakre J. 1985. b-Adrenergic induced K⁺ current in *Xenopus* oocytes: Role of cAMP, inhibition by muscarinic agents. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 223:389–402.
- Wasserman WJ, Masui Y. 1974. A study on gonadotropin action in the induction of oocyte maturation in *Xenopus laevis*. *Biol Reprod* 11:133–144.
- Wibrand F, Honoré E, Lazdunski M. 1992. Opening of glibenclamide-sensitive K⁺ channels in follicular cells promotes *Xenopus* oocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5133–5137.
- Woodward RM, Miledi R. 1987a. Hormonal activation of ionic currents in follicle enclosed *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:4135–4139.
- Woodward RM, Miledi R. 1987b. Membrane currents elicited by porcine vasoactive intestinal peptide (VIP) in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 231:489–497.
- Yoshida S, Plant S. 1991. A potassium current evoked by growth hormone-releasing hormone in follicular oocytes of *Xenopus laevis*. *J Physiol (London)* 443:651–667.
- Ziganshin AU, Ziganshina LE, King BE, Burnstock G. 1995. Characteristics of ecto ATPase of *Xenopus* oocytes and the inhibitory actions of suramin on ATP breakdown. *Pflügers Arch* 429:412–418.