



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
CAMPUS UNAM JURQUILLA**

**RECEPTORES P2Y SENSIBLES A UTP EN CÉLULAS DE LA TECA DEL
FOLÍCULO OVÁRICO DE MAMÍFERO**

TESIS

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

P R E S E N T A:

Q.F.B. ERIKA PAOLA ZÁRATE DÍAZ

DIRECCIÓN DE TESIS:

DR. ROGELIO ARELLANO OSTOA

DR. FRANCISCO GABRIEL VÁZQUEZ CUEVAS

JURIQUILLA, QUERÉTARO. NOVIEMBRE 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado de Examen de Grado certificamos que la tesis elaborada por: Erika Paola Zárate Díaz, cuyo título es: “Receptores P2Y sensibles a UTP en células de la teca del folículo ovárico de mamífero”, se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente:

Dra. Maricela Luna Muñoz

Secretario:

Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas

Vocal:

Dr. Rafael Villalobos Molina

Suplente:

Dra. María del Carmen Clapp Jiménez Labora

Suplente:

Dr. Daniel Reyes Haro

Aprobado por el Comité Académico

Dra. María Teresa Morales Guzmán
Coordinadora del Programa
Maestría en Ciencias (Neurobiología)

Este trabajo se realizó en el Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Rogelio Arellano Ostoia y del Dr. Francisco G. Vázquez Cuevas. El proyecto fue apoyado por CONACyT (No. 82340) Y PAPIIT-UNAM (IN208209 e IN214409).

Parte de este trabajo fue publicado en: Vázquez-Cuevas F, Zárate-Díaz EP, Garay E, Arellano RO. 2010. Functional expression and intracellular signaling of UTP-sensitive P2Y receptors in theca-interstitial cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8: 88.

Además, fue presentado en un congreso nacional: Zárate-Díaz EP, Vázquez-Cuevas F, Garay E, Arellano RO. 2009. Expresión de los receptores P2Y en teca de mamífero. LII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Morelia, Michoacán.

RESUMEN

La teca folicular constituye un elemento fundamental en el eje neuroendocrino que regula la función ovárica, ya que recibe y procesa información hormonal proveniente de la hipófisis y realiza la biosíntesis de hormonas esteroides, fenómenos indispensables en la foliculogénesis. Existe evidencia de que sistemas de comunicación intraovárica regulan sus funciones a través de transmisores químicos. El sistema purinérgico es uno que frecuentemente se expresa en el ovario de una gran diversidad de especies; sin embargo, su papel fisiológico aún se desconoce. Los receptores purinérgicos P2Y pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G, su ligando endógeno es el ATP. El objetivo del presente estudio fue caracterizar la expresión y función de los receptores P2Y que son sensibles a UTP (P2Y2, P2Y4 y P2Y6) en las células de la teca; en otros tipos celulares estos receptores regulan procesos como la proliferación y la diferenciación celular.

El análisis de la expresión de receptores por RT-PCR evidenció los transcritos de P2Y2 y P2Y6 en cultivos primarios de células de la teca. Los estudios funcionales por microscopía de fluorescencia mostraron que ATP o UTP provocaron un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} que fue dependiente de la dosis ($EC_{50} = 1.32 \pm 0.6$ y $1.15 \pm 0.82 \mu M$, respectivamente). Mientras que la suramina, antagonista de los receptores P2Y2, inhibió en un 50% la respuesta a $10 \mu M$ de UTP. En conjunto, nuestros datos muestran que la respuesta funcional evaluada depende principalmente de la activación del receptor P2Y2.

SUMMARY

Theca cells are fundamental in the neuroendocrine axis that regulates the ovarian function, since they receive and process hormonal information that originates in the hypophysis and have a central role in steroid hormone biosynthesis, a crucial phenomena for folliculogenesis. There exists evidence indicating that intraovarian communication systems, through the action of several chemical transmitters, are involved in regulating ovarian function. The purinergic system is expressed most consistently in the ovary of several species; however, its physiological role remains unknown. P2Y purinergic receptors belong to the G-protein coupled receptor superfamily, and their endogenous agonist is ATP; these receptors regulate physiological processes such as cell proliferation and differentiation in various cell types. The main goal here was to characterize the expression and function of P2Y receptors sensitive to UTP (P2Y2, P2Y4, and P2Y6) in theca cells.

The expression of P2Y2 and P2Y6 transcripts in theca was detected by RT-PCR. A functional analysis using fluorescence microscopy to monitor changes in Ca^{2+} intracellular concentration showed that ATP or UTP elicited an increase of Ca^{2+} in a dose-dependent manner ($\text{EC}_{50} = 1.32 \pm 0.6$ and $1.15 \pm 0.82 \mu\text{M}$, respectively). Suramin, a P2Y receptor antagonist with more potency on P2Y2 subtype, blocked only 50% of the response elicited by $10 \mu\text{M}$ UTP. Together, our data demonstrate that functional responses were due mainly to P2Y2 receptor activation.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (becaria No. 270265), así como a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (cuenta No. 509003625) por el apoyo económico otorgado durante la realización de este proyecto.

Así mismo, agradezco al Dr. Francisco Vázquez Cuevas y al Dr. Rogelio Arellano Ostoa, por su apoyo para la realización de este proyecto de investigación y por permitirme ser parte del grupo del laboratorio D-13 del Instituto de Neurobiología de la UNAM.

Agradezco además a la Dra. Carmen Clapp y a la Dra. Anaid Antaramian, miembros del comité tutorial, por sus críticas y comentarios en cada uno de los tutorales y por ser pieza clave en la corrección del presente escrito.

A los miembros del jurado: la Dra. Maricela Luna Muñoz, el Dr. Rafael Villalobos Molina y al Dr. Daniel Reyes Haro, por servirse a leer y comentar este escrito y a sus atinadas observaciones al mismo.

Además, agradezco el apoyo técnico al M.V.Z. Martín García Servín, encargado del bioterio, por la ayuda con los animales de experimentación; a la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos, por su ayuda con las imágenes de microscopía confocal; a la M. en C. Leonor Casanova Rico, por su ayuda en todos los trámites administrativos; al Ing. Ramón Martínez Olvera; a la Dra. Dorothy Pless por su ayuda en la revisión del artículo en inglés; al Sr. Horacio Benjamín Ramírez Leyva, auxiliar de laboratorio, así como a la Dra. Edith Garay y a mis compañeros del laboratorio D-13, especialmente a la Biol. Leticia Robles y a la Biol. Bárbara Serrano por toda la ayuda técnica y académica que recibí durante la realización de este proyecto.

A mi familia: mis padres, mis hermanos, mi sobrino y a Rubén Gustavo....

ÍNDICE

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Regulación neuroendocrina de la foliculogénesis	1
1.2 Células de la teca	3
1.2.1 <i>Síntesis de andrógenos en el folículo ovárico</i>	5
1.2.3 <i>Fisiopatología de las células de la teca</i>	7
1.3 El sistema de señalización purinérgica en el ovario	8
1.3.1 <i>Expresión de receptores purinérgicos en el folículo ovárico de la rana <i>Xenopus laevis</i></i>	8
1.3.2 <i>Expresión de receptores purinérgicos en el ovario de mamífero</i>	9
1.4 Fuentes de ATP en el ovario	10
1.4.1 <i>Liberación de ATP en distintos tipos celulares</i>	10
1.4.2 <i>Inervación en el ovario de mamífero</i>	12
1.5 Receptores purinérgicos	13
1.5.1 <i>Generalidades de los receptores P2Y</i>	14
1.5.2 <i>Farmacología de los receptores P2Y</i>	15
1.6 Mecanismos de señalización y acciones celulares de los receptores P2Y sensibles a nucleótidos de uridina	16
1.6.1 <i>El receptor P2Y2</i>	17
1.6.2 <i>El receptor P2Y4</i>	18
1.6.3 <i>El receptor P2Y6</i>	19
2. ANTECEDENTES	20

3. JUSTIFICACIÓN	21
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS	24
6.1 Cultivo celular	24
6.2 Transcripción reversa y PCR	24
6.3 Registro de la concentración de Ca²⁺ intracelular	26
6.4 Inmunocitoquímica	27
7. RESULTADOS	28
7.1 Cultivo de células de la teca	28
7.2 Identificación de los transcritos de los receptores P2Y2, P2Y4 y P2Y6 en células de la teca	31
7.3 Caracterización farmacológica de los receptores P2Y por microscopía de fluorescencia funcional	33
<i>7.3.1 Respuesta de las células de la teca a ATP</i>	34
<i>7.3.2 Respuesta de las células de la teca a UTP</i>	35
<i>7.3.3 Respuesta de las células de la teca a UDP</i>	37
<i>7.3.4 Curva de inhibición con suramina</i>	38
8. DISCUSIÓN	40
9. CONCLUSIONES	45
10. REFERENCIAS	46
11. ÍNDICE DE FIGURAS	60
12. ÍNDICE DE TABLAS	62

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Regulación neuroendocrina de la foliculogénesis

El control del crecimiento y desarrollo del folículo ovárico es un proceso fundamental en la reproducción conocido como foliculogénesis; éste es regulado a través de una compleja red de comunicación entre el cerebro, la hipófisis y las gónadas (Figura 1). El punto principal en la jerarquía de este sistema regulatorio es la producción y secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), por parte de las células del área preóptica del cerebro, más específicamente por el núcleo infundibular o arcuato del hipotálamo. La síntesis de la GnRH es un proceso que involucra la comunicación de varios elementos en el sistema nervioso central, particularmente las interacciones glía-neurona-células endoteliales (Prevot et al., 2004).

Las terminaciones de las neuronas que componen el núcleo arcuato acaban principalmente en la eminencia media del hipotálamo, donde liberan GnRH de manera pulsátil al sistema vascular porta hipotálamo-hipofisiario. La GnRH es transportada a la adenohipófisis por la circulación portal, donde estimula la liberación de las gonadotropinas LH (hormona luteinizante) y FSH (hormona estimulante del folículo).

Durante el ciclo reproductivo, la liberación de GnRH a los vasos sanguíneos del sistema porta hipotálamo-hipofisiario es modulada por una serie de alteraciones dinámicas de las relaciones anatómicas que existen entre las terminales nerviosas GnRHérgicas y los procesos celulares de la glía en la eminencia media en el hipotálamo. Estos rearrreglos plásticos y la secreción de la GnRH parecen estar modulados, al menos en parte, por moléculas de señalización específicas secretadas tanto por las células gliales y endoteliales. Actualmente existen evidencias que confirman la participación de diversos factores; las células gliales usan miembros de la familia de factores de crecimiento del factor de crecimiento epidermal (EGF), actuando vía receptores con actividad de tirosina-cinasa, para modular esta respuesta, mientras que las células del endotelio de la eminencia media emplean óxido nítrico (NO) para facilitar la liberación de la GnRH (Prevot et al., 2004).

Tanto la LH como la FSH son secretadas por las mismas células de la adenohipófisis, los gonadotropos, y se sabe que ambas gonadotropinas ejercen sus efectos sobre sus receptores localizados en las células ováricas activando principalmente el sistema de síntesis de AMP cíclico (AMPc). En la hembra, el patrón de GnRH varía a través del ciclo menstrual/estral, el cual es regulado de manera muy precisa por retroalimentación de los esteroides gonadales (estrógenos y progesterona) en el hipotálamo y la hipófisis, estableciendo un circuito de retroalimentación. La anatomía precisa y los mecanismos funcionales que permiten este efecto de retroalimentación de los esteroides en las neuronas GnRHérgicas siguen en estudio. Sobre el eje, también actúan una serie de factores ambientales e internos que afectan la fertilidad tales como el fotoperíodo (Guyton, 1997).

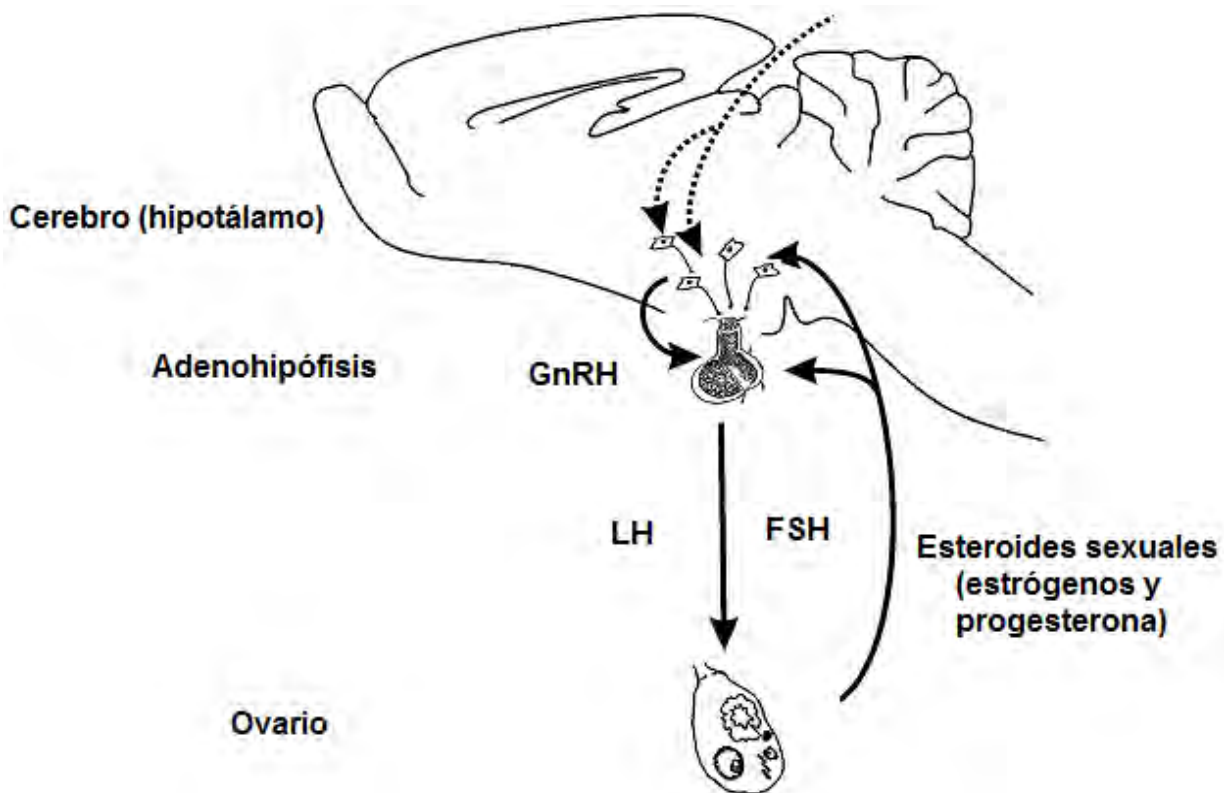


Figura 1. Eje hipotálamo-hipófisis-ovario, el cual es regulado mediante circuitos de retroalimentación negativa, entre la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), las gonadotropinas LH y FSH y los esteroides sexuales, estrógenos y progesterona, regulando así su secreción por parte del hipotálamo, adenohipófisis y ovario, respectivamente.

Además de los mecanismos hormonales ejercidos por las gonadotropinas, existen otros sistemas de señalización intraovárica involucrados en el proceso de la foliculogénesis, por ejemplo, los mediados por factores de crecimiento, de diferenciación y neurotransmisores (Armstrong & Webb, 1997); estos sistemas de señalización celular participan principalmente regulando las etapas tempranas de la foliculogénesis, que son independientes de las hormonas gonadotrópicas, por ejemplo, el reclutamiento de folículos primordiales del *pool* de reserva (Mayerhofer et al., 1997).

Un ejemplo de estos mensajeros celulares son las catecolaminas, como la epinefrina y la norepinefrina, las cuales son liberadas en las terminales simpáticas que inervan el ovario y que ejercen sus acciones a través de receptores acoplados a proteínas G expresados en diferentes tipos celulares del ovario. La activación de estas vías puede regular una amplia gama de respuestas celulares (Cotecchia et al., 1998). En células de la teca y de la granulosa de rata se ha demostrado la presencia de receptores β_2 -adrenérgicos (Aguado et al., 1982), por lo que se ha sugerido las catecolaminas participan en la adquisición de la sensibilidad a las gonadotropinas por el folículo (Mayerhofer et al., 1997). En cultivos primarios de células de la teca la norepinefrina amplifica la secreción de andrógenos estimulada por la LH (Dyer & Erickson, 1985) y estas respuestas parecen ser mediadas por AMPc. Además en el ovario existen células cromafines capaces de sintetizar *de novo* la norepinefrina (Wrutniak-Zolnowska, 1980), por lo que se sugiere que la norepinefrina ovárica es un modulador de la respuesta esteroideogénica del folículo.

1.2 Células de la teca

Las células de la teca rodean al folículo, y se diferencian desde el inicio de la etapa de folículos secundarios (Bjersing, 1978). Es la estructura que está en contacto directo con el riego sanguíneo y con el sistema nervioso periférico, pues estos sistemas no penetran el folículo ovárico y no llegan al ovocito de manera directa. La teca, por ende, se encarga de integrar la información hormonal y nerviosa que recibe el folículo

(Figura 2). En el folículo antral, las células de la teca están constituidas por dos capas, la teca externa y la teca interna, originadas a partir del mesénquima.

Fisiológicamente las células de la teca interna son el principal sitio de síntesis de andrógenos en el ovario (Tajima et al., 2007), durante toda la foliculogénesis y constituyen el sustrato para la síntesis de los estrógenos, producidos únicamente en células de la granulosa por la aromatasa bajo la regulación de la FSH (Fujita et al., 1981).

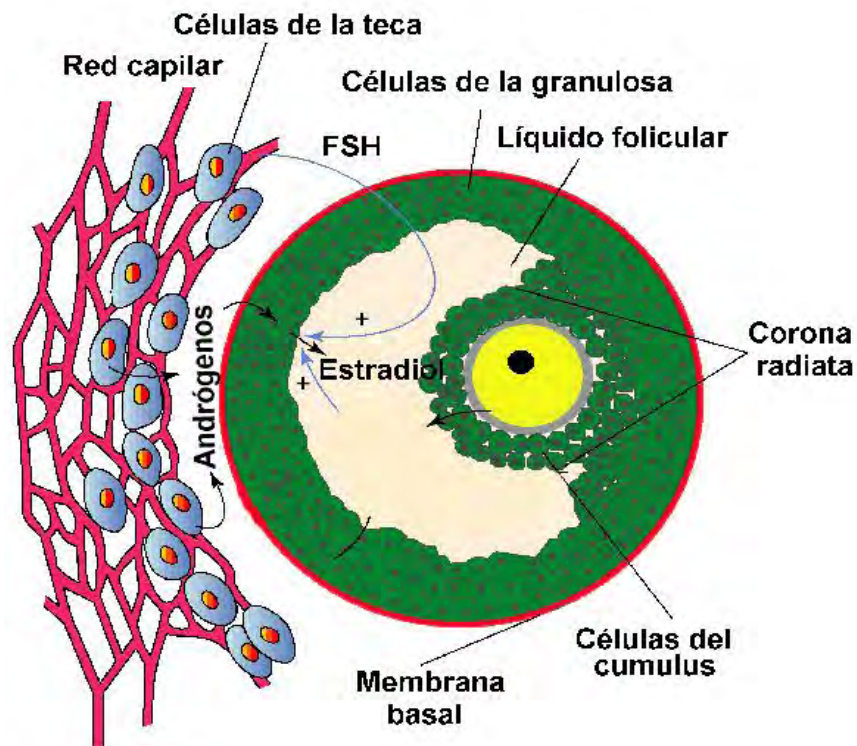


Figura 2. Esquema de las estructuras principales que conforman el folículo ovárico (modificado de Armstrong & Webb, 1997).

La LH es la principal hormona que controla la diferenciación celular de la teca y su función esteroidogénica (Ericksson et al., 1985; Hillier, 1994; Magoffin, 2004; Alviggi et al., 2006). La ruta de señalización intracelular de las acciones tróficas de la LH en la esteroidogénesis en las células de la teca parece estar mediada por las proteínas cinasas A (PKA) de tipos I y II, dependientes de AMPc (Richards et al., 1986; Magoffin, 1989), estimulando la expresión de enzimas esteroidogénicas que permiten la síntesis

de andrógenos, tales como citocromo P450 *side chain cleavage* (CYP11A), la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR, por sus siglas en inglés); la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) y el citocromo P450 C17 (CYP17) (Magoffin, 2004). Recientemente se ha reportado la activación de cinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs) por la LH, que regula la expresión de CYP17 (Tajima et al., 2007), estimulando la producción de andrógenos.

1.2.1 Síntesis de andrógenos en el folículo ovárico

Los esteroides gonadales son producidos a partir del colesterol por una de tres posibles fuentes: a) de colesterol proveniente de la sangre, b) de colesterol almacenado dentro de la célula ovárica, o liberado de los ésteres de colesterol almacenados dentro de las gotas lipídicas o c) del colesterol sintetizado *de novo* en la célula ovárica. El que se utilice una u otra de estas fuentes de colesterol para la síntesis de andrógenos depende de la especie, del tipo celular involucrado y del estado fisiológico (Strauss et al., 1981). El colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de alta densidad (HDL) es precursor esteroidogénico en las células de la teca (Gwynne et al., 1982).

En la teca y bajo el control de la LH, el colesterol es transportado a la célula por la enzima StAR y el primer paso en su conversión a esteroides es el rompimiento del enlace C-20,22, resultando un compuesto de 21 carbonos, la pregnenolona, y un fragmento de 6 carbonos, el aldehído isocaproico. El sistema enzimático que cataliza esta reacción se localiza en el lado interno de la matriz mitocondrial (Farkash et al., 1986), que comprende entre otras enzimas, a la CYP11A (Strauss et al., 1981), la cual es la encargada de romper el colesterol para formar estos dos productos, de los cuales, la pregnenolona es convertida a progesterona por una enzima deshidrogenasa. De manera similar se lleva a cabo la conversión de la pregnenolona a DHEA por acción de otra enzima perteneciente a la familia de los citocromos P450, la CYP17A. Y, finalmente, en la teca se lleva a cabo la conversión de progesterona y DHEA a 17 α -OH-progesterona y androstenediona, respectivamente, bajo la acción de la 3 β -HSD. Este es el paso limitante en la biosíntesis de andrógenos en el folículo, está sujeto a regulación

hormonal y es uno de los puntos clave en el cual ocurre el control fisiológico de la secreción folicular de los esteroides.

La androstenediona y la testosterona son convertidas a estrona y estradiol-17 β respectivamente, en las células de la granulosa, por un complejo enzimático “aromatasa”, que comprende a una citocromo P450 con función de oxidasa que cataliza múltiples pasos de la reacción (Figura 3) (Lieberman et al., 1984; Knobil & Neill, 1994; Magoffin, 2005).

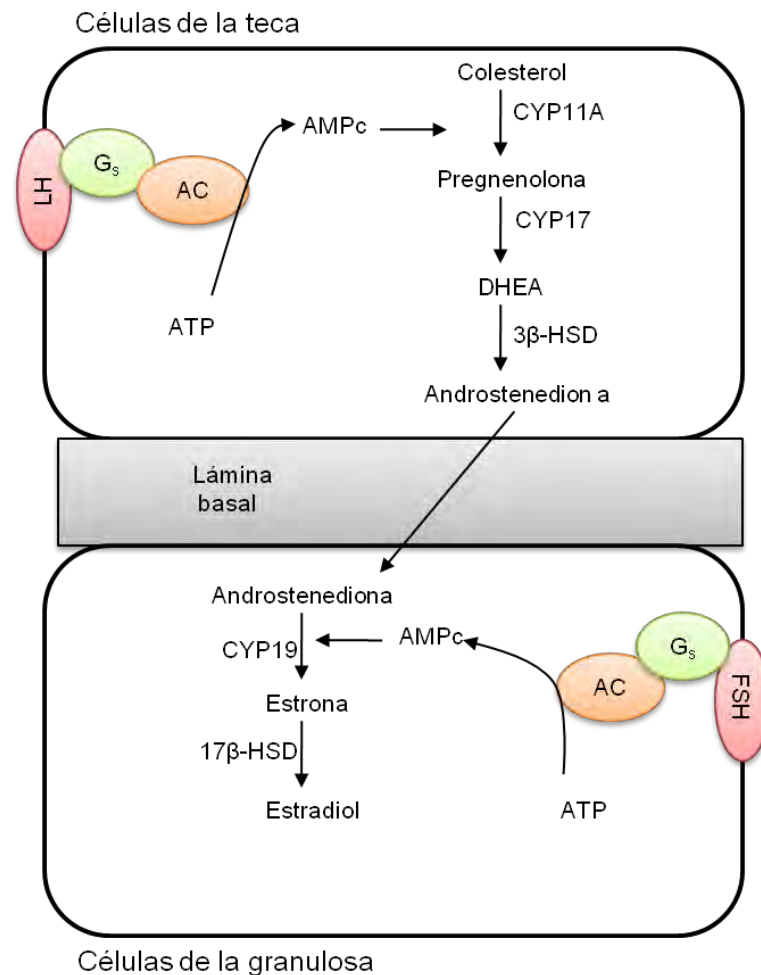


Figura 3. Comunicación entre la capa de células de la teca y las células de la granulosa, donde ocurre la síntesis de esteroides sexuales, la maquinaria enzimática involucrada, además la transducción de señales, relacionada con los receptores acoplados a proteína G de las gonadotropinas LH y FSH (modificado de Magoffin, 2005).

1.2.2 Otros papeles fisiológicos de las células de la teca

Además de su papel en la esteroidogénesis, las células de la teca participan en el proceso de ovulación. Se sabe que al final de su crecimiento, el folículo maduro descarga hormonas gonadotrópicas para dar lugar a diversas transformaciones, que finalizan con la ruptura del folículo y la liberación del ovocito. Las células del *cumulus* secretan grandes cantidades de ácido hialurónico, el cual se acumula en el espacio intercelular y provoca la disociación del *cumulus* seguido por su ruptura: el ovocito, que se encuentra rodeado por una cierta cantidad de células de la granulosa, es liberado en el líquido folicular. El estroma ovárico experimenta vasoconstricción, la cual en pocas horas resulta en una isquemia seguida por necrosis del estroma y de la pared folicular. La descarga de gonadotropinas libera histamina y bradicinina, conduciendo a un edema de las células de la teca. Al mismo tiempo, la secreción del activador de plasminógenos activará a las colagenasas, las cuales disocian la teca externa, siendo esta acción reforzada por la liberación de prostaglandinas. Finalmente, las células del epitelio ovárico en la región apical parecerían estar sujetas a la autólisis, y esto permite la liberación de hidrolasas lisosomales y así, la disociación del ápice, lo que culmina con la expulsión del ovocito (Chappell, 1991).

1.2.3 Fisiopatología de las células de la teca

Una de las patologías que pueden originarse por alteraciones fisiológicas de las células de la teca se encuentra el síndrome del ovario poliquístico (PCOS, por sus siglas en inglés), el cual se asocia con ciclos menstruales irregulares, infertilidad, hirsutismo y un riesgo incrementado de desarrollar diabetes. El indicador temprano de PCOS es anovulación crónica acompañada por altos niveles de andrógenos en el suero sanguíneo. Posteriormente se observa un arresto característico en el crecimiento de los folículos antrales en estadios tempranos.

Dado que las células de la teca son la fuente principal de estos andrógenos, el PCOS puede asociarse con hipertrofia e hiperplasia de este tipo celular. La característica más notable, morfológicamente hablando, es el gran número de “quistes”

que se encuentran en el ovario, de ahí el nombre “poliquístico”. La mayoría de los folículos en los ovarios poliquísticos contienen una teca hipertrofiada (Leung & Adashi, 2004).

1.3 El sistema de señalización purinérgica en el ovario

1.3.1 Expresión de receptores purinérgicos en el folículo ovárico de la rana *Xenopus laevis*

Uno de los sistemas de señalización intraovárica descritos recientemente ocurre vía sustancias derivadas de bases nucleotídicas, especialmente purinas y pirimidinas. Por ejemplo, ha sido reportada la expresión y funcionalidad de receptores sensibles a ATP en diversos sistemas relacionados al ovario de diferentes especies. Trabajos publicados de nuestro grupo reportan la expresión de diversos receptores purinérgicos en el ovocito de *Xenopus laevis* (Arellano et al., 1996, 1998; Saldaña et al., 2005, 2009) y en mamífero (Arellano et al., 2002; Vázquez-Cuevas et al., 2006, 2010). En el caso del ovocito de *Xenopus*, los datos apuntan a que estos receptores participan en el desarrollo del folículo vía la modulación de procesos como la maduración del gameto. Los efectos provocados por la estimulación purinérgica en el folículo de *Xenopus* incluyen la activación de enzimas membranales que aumentan el AMPc y el Ca^{2+} intracelular, a través de la síntesis de inositol trifosfato (IP_3), dos sistemas de segundos mensajeros que controlan una gran diversidad de funciones en todas las células conocidas; es por ello fundamental la investigación sobre los efectos que estas acciones purinérgicas promueven en la función ovárica. Algunas de las respuestas celulares inmediatas al aumento de AMPc y de Ca^{2+} intracelular en las células ováricas, a través de receptores purinérgicos, es la activación de diversas corrientes iónicas transmembranales; por ejemplo, se sabe que ATP estimula al menos dos corrientes entrantes acarreadas por Cl^- , que se han denominado F_{Cl} y S_{Cl} (de acuerdo a su curso temporal: *fast* y *slow*) (Arellano et al., 1996, 1998), y activa una corriente de K^+ que se genera por el incremento del AMPc (Saldaña et al., 2005). Estas acciones del ATP son

promovidas a través de diferentes receptores; sin embargo, aún no es claro si se requiere la expresión de diferentes receptores, o por el contrario, son producto de las interacciones funcionales entre un solo receptor a ATP y otras moléculas membranales (Arellano et al., 2009).

1.3.2 Expresión de receptores purinérgicos en el ovario de mamífero

En el laboratorio también se ha explorado la expresión de receptores purinérgicos P2 en el ovario de mamífero, utilizando distintas aproximaciones experimentales. En las células de la granulosa hemos detectado los transcritos de todos los receptores P2X conocidos (P2X1-P2X7), así como los receptores P2Y2 y P2Y6 (Juárez-Espinosa, 1999; Garay & Arellano, 2001; Arellano et al., 2002); en células de la teca identificamos a los receptores P2X1, P2X4, P2X7, P2Y2 y P2Y6 (Juárez-Espinosa, 2006; Vázquez-Cuevas et al., 2006, 2010), mientras que en el epitelio ovárico superficial (OSE) mostramos la expresión de los receptores P2X1, P2X4, P2X7 y P2Y2 (Juárez-Espinosa, 2006). Además, existen evidencias claras de que la diversidad podría ser aún mayor e incluir varias proteínas generadas por corte y empalme (*splicing*) alternativo (Garay & Arellano, 2001). Respecto a los receptores de interés para el presente estudio, los primeros reportes de la expresión de receptores sensibles a UTP (anteriormente llamados receptores tipo P2U) en el ovario, fueron hechos para las células de la granulosa-luteales de humano y porcino (Kamada et al., 1994). La estimulación de estos receptores induce un aumento en el Ca^{2+} intracelular: cuando se estimula con ATP se potencia la secreción de progesterona y estradiol, mientras que si se estimulan con UTP se inhibe la producción de ambas hormonas (Kamada et al., 1994). Estas diferencias farmacológicas no podían explicarse en su momento porque la descripción molecular de los receptores aún estaba incompleta.

Estudios posteriores han corroborado estos hallazgos, donde además de confirmar la expresión de receptores purinérgicos sensibles a UTP en células de la granulosa-luteales humanas, se profundizó en los posibles efectos antigonadotrópicos del UTP en esas células. En cultivos primarios de células granulosa-luteales humanas la activación del receptor regula de manera negativa la producción de AMPc, activada

por LH y este efecto depende de la activación de la PKC α (Tai et al., 2001a). Además se ha descrito que el ATP es capaz de activar a las MAPK ERK1/2 e inducir proliferación celular en células de la granulosa-luteales humanas (Tai et al., 2001b).

En estudios previos de nuestro laboratorio se demostró que en el ovocito rodeado por las células del *cumulus*, agonistas de los receptores P2Y activan dos corrientes iónicas entrantes, la primera es una corriente de Cl $^-$ dependiente de Ca $^{2+}$ y la segunda corresponde a la apertura de canales catiónicos que son modulados por Ca $^{2+}$ extracelular. En este estudio las corrientes se registraron por electrodos colocados en el ovocito y ambas respuestas fueron bloqueadas por el desacoplamiento de las uniones comunicantes, lo cual permite establecer que las corrientes tienen su origen en las células del *cumulus* y que la respuesta es transmitida al ovocito a través de estas uniones. El receptor responsable de estas respuestas es del tipo P2Y2 (Arellano et al., 2002) y/o P2Y4, por lo que el aumento de Ca $^{2+}$ necesario para activar la corriente de Cl $^-$ dependiente de Ca $^{2+}$ podría deberse a la activación de la fosfolipasa C (PLC) y la síntesis de IP $_3$. En conjunto, estos hallazgos permiten sugerir que el ATP, actuando a través de receptores del tipo P2Y, modula aspectos fisiológicos del desarrollo y el crecimiento folicular en mamíferos.

1.4 Fuentes de ATP en el ovario

1.4.1 Liberación de ATP en distintos tipos celulares

La liberación de ATP ha sido documentada en varios tipos celulares, tanto neuronales como no neuronales. En estudios pioneros se observó un aumento en la densidad óptica a 260 nm cuando se estimulaba el nervio auricular, viendo posteriormente que correspondía a la liberación de ATP, por lo se propuso que el ATP podría tener un papel como transmisor químico en células neuronales (Holton & Holton, 1954).

Estudios en la década de los 60s describieron la transmisión purinérgica, realizándose experimentos con nervios de rana estimulados eléctricamente, donde se

liberaba ATP y esto producía la despolarización de la membrana postsináptica (Abood et al., 1962).

Durante esos años se habló de la existencia de algunas sinapsis donde el neurotransmisor involucrado era una molécula desconocida y algunos trabajos relacionados descartaban la participación de la noradrenalina (norepinefrina) y acetilcolina, por lo que a esas sinapsis se les denominó como “no adrenérgicas, no colinérgicas” (NANC). Posteriormente, se demostró que el neurotransmisor liberado en las sinapsis NANC era ATP, denominándose a los nervios involucrados como “nervios purinérgicos” (Burnstock et al., 1970). Después de ese hallazgo, se demostró que el ATP no era liberado de manera unitaria, sino que se involucraban otros neurotransmisores, usualmente de forma equimolar, tales como la acetilcolina y la norepinefrina, estableciéndose la hipótesis de la “cotransmisión purinérgica” (Su et al., 1971).

Actualmente se ha demostrado que el ATP es un transmisor químico en numerosos sistemas neuronales, tanto a nivel de sistema nervioso central (SNC) como periférico, encontrándose en los sistemas simpático, parasimpático y entérico (Burnstock, 1999).

En el SNC se ha demostrado que la liberación de ATP en el cerebro de rata no es uniforme, lo que sugiere que tiene funciones específicas en ciertas regiones, por ejemplo, la estimulación eléctrica de las cortezas motora y sensorial provoca la liberación de ATP, produciéndose efectos excitatorios, por lo que se ha propuesto que el ATP tiene un papel en la función motora y en la transmisión de ciertos estímulos, tales como los de tipo nociceptivo (Burnstock, 1996).

Además de su papel en el SNC, se ha demostrado que el ATP puede ser liberado por diferentes tipos celulares como células sanguíneas (plaquetas, monocitos y eritrocitos), células de músculo esquelético y de músculo cardíaco, células β pancreáticas, células gliales (astrocitos), células de Sertoli y condrocitos, siendo los principales estímulos utilizados el choque osmótico, la estimulación mecánica, la acidosis y la hipoxia (Bodin & Burnstock, 2001).

En el ovocito de *X. laevis*, estudios de nuestro laboratorio han mostrado que la estimulación mecánica del folículo de *Xenopus* provoca una corriente entrante,

acarreada por Cl^- , que ha sido nombrada como I_{mec} . Esta corriente iónica es dependiente del acoplamiento eléctrico entre las células foliculares y el ovocito, ya que la defoliculación (o el desacoplamiento mediante drogas) la elimina. Además esa respuesta es eliminada por la suramina, un antagonista competitivo de los receptores purinérgicos P2, lo que significa que es mediada por ATP. En estos estudios se demostró que la respuesta es activada por la liberación de ATP desde el ovocito, el cual difunde y estimula de forma paracrina a receptores expresados en la membrana de las células foliculares, generando en las mismas células la respuesta I_{mec} (Saldaña et al., 2009).

1.4.2 Inervación en el ovario de mamífero

La inervación extrínseca del ovario comprende nervios sensoriales y simpáticos, así como una cantidad más reducida de nervios parasimpáticos. Estos nervios se originan de neuronas localizadas en el cerebro, la médula espinal o en ganglios periféricos. La inervación simpática de la glándula está representada por fibras catecolaminérgicas y de neuropéptido Y (NPY). La inervación sensorial está dada por nervios que contienen a la sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP). Se sabe que también inervan al ovario fibras que contienen al péptido intestinal vasoactivo (VIP), tanto simpáticas como sensoriales. Estos nervios extrínsecos alcanzan el órgano mediante dos rutas: el nervio del plexo ovárico (OPN), que va a lo largo de la arteria ovárica y el nervio ovárico superior (SON) en el ligamento suspensorio.

Está bien establecido que en un gran número de terminales simpáticas se coliberan de manera equimolar norepinefrina y ATP (Westfall et al., 2002), y este tipo de inervación es, potencialmente, una de las fuentes principales de ATP en el ovario.

Se ha sugerido que esta información nerviosa ejerce un papel regulatorio en la fisiología ovárica. Por ejemplo, la simpatectomía de un ovario no afecta el desarrollo folicular o el número total de folículos en cualquier día del ciclo estral, por lo que se ha sugerido que cuando los dos ovarios están presentes las hormonas controlan el desarrollo folicular. Cuando un ovario es removido, el entorno hormonal es alterado y el

sistema nervioso, a través de los nervios influyen sobre el crecimiento folicular (Curry et al., 1984).

Por otra parte, la sección unilateral o bilateral del SON en ratas prepúberes sugiere que la inervación regula de manera positiva procesos orquestados por las gonadotropinas en el ovario, por ejemplo, la ovulación. A este respecto, se ha propuesto que la existencia de un efecto modulador de las gonadotropinas sobre la ovulación, ya que en experimentos realizados en ratas con sección bilateral del SON donde se induce la ovulación por tratamiento hormonal, ésta se mantiene, a pesar de la denervación (Morales et al., 1998).

Se ha investigado la función de ciertos neurotransmisores en algunos procesos fisiológicos propios del folículo, por ejemplo, existen estudios que muestran un papel preponderante de neurotransmisores como VIP y norepinefrina en el desarrollo folicular temprano (en rata), de manera independiente de las gonadotropinas (Schwartz et al., 1974), debido a que los folículos en estos estadios no expresan receptores a estas hormonas. Esos neurotransmisores actúan en el folículo primordial promoviendo su crecimiento y además están involucrados en la expresión posterior de los receptores a FSH en el folículo, para que después las gonadotropinas tomen el control del desarrollo folicular (Mayerhofer et al., 1997).

1.5 Receptores purinérgicos

Los receptores purinérgicos son proteínas de membrana que tienen como agonistas a purinas y a pirimidinas, como ATP, ADP, UTP, UDP y adenosina (ADO). De acuerdo a su farmacología, se han clasificado en: P1, los cuales son afines a la adenosina y los receptores P2, que son sensibles a ATP, ADP, UTP y UDP. En este trabajo se hará referencia sólo a estos últimos. Los receptores P2 están agrupados en dos familias, de acuerdo a su estructura molecular y su mecanismo de acción: P2X, que son canales catiónicos, de los cuales se conocen siete genes que codifican para las subunidades 1 a la 7; y P2Y, que son receptores acoplados a proteínas G (Ralevic & Burnstock, 1998). Sus acciones fisiológicas son relevantes, por ejemplo, la activación

del receptor del canal P2X7 induce muerte celular, y se ha propuesto que en su conformación activa, el receptor se asocia con la panexina 1 (Pelegriin & Surprenant, 2006), para formar una estructura denominada “megaporo”, permeable a moléculas de hasta 1 KDa; en este caso, el receptor no se desensibiliza y los niveles elevados y sostenidos de Ca^{2+} intracelular activan la maquinaria apoptótica (Burnstock, 2007).

1.5.1 Generalidades de los receptores P2Y

Los receptores P2Y pertenecen a la clase I de la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), con 7 dominios transmembranales (TM) (Figura 4). Hasta ahora, se han clonado y caracterizado 8 subtipos: P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 y P2Y11-14. Son proteínas de 308-377 aminoácidos y los genes que las codifican no contienen intrones en su secuencia codificante, con la excepción del receptor P2Y11. Para los receptores P2Y1 y P2Y2, los aminoácidos cargados positivamente en los dominios transmembranales 3, 6 y 7, parecen estar involucrados en la interacción con los fosfatos del ATP, formándose una cesta, siendo ésta el sitio de interacción con el ligando (Jiang et al., 1997).

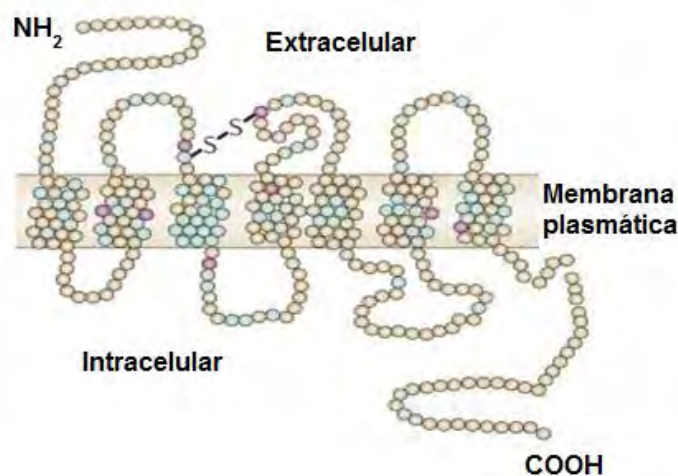


Figura 4. Estructura molecular general propuesta para los receptores P2Y, los cuales pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), con 7 dominios transmembranales (Modificado de Barnard et al., 1994).

Los receptores P2Y han sido clasificados con base en varios criterios como su filogenia, farmacología e interacción con una proteína G específica. De acuerdo a esto, existen dos grandes grupos: el primero comprende a los receptores P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 y P2Y11 y el otro grupo, a P2Y12, P2Y13 y P2Y14, siendo éstos los de mayor porcentaje de identidad entre sí (Jacobson et al., 2002; Abbracchio et al., 2003).

Estos grupos muestran motivos estructurales compartidos en el TM7. El primer grupo posee el motivo Q/K-X-X-R y el segundo grupo el motivo K-E-X-X-L. Se ha descrito que estas secuencias tienen una importancia primordial en la interacción con sus agonistas (Erb et al., 1995; Jiang et al., 1997b; Boarder & Webb, 2001; Jacobson et al., 2002).

Los receptores del primer grupo (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 y P2Y11) se acoplan principalmente a $G_{q/11}$ para activar la vía de la PLC/IP₃ y liberar Ca^{2+} intracelular (Ca^{2+}_i). El segundo grupo se acopla principalmente a $G_{i/o}$, por lo que inhibe la adenilato ciclasa (AC), por lo tanto, disminuye los niveles de AMPc (Fumagalli et al., 2003; Bianco et al., 2005).

1.5.2 Farmacología de los receptores P2Y

La selectividad y potencia de los ligandos purinérgicos permite diferenciar, con distinto grado de especificidad, a los receptores P2Y. Así, los receptores P2Y1, P2Y12 y P2Y13 son más sensibles a ADP; los receptores P2Y11 son sensibles al ATP; los receptores P2Y2, P2Y4 y P2Y6 son sensibles a nucleótidos de uridina (UTP/UDP) y el receptor P2Y14 es sensible a los azúcares de UDP (UDP-glucosa y UDP-galactosa) (tabla 1).

En el caso de los antagonistas, la mayoría son compuestos policíclicos cargados negativamente que bloquean ciertas respuestas de los receptores P2Y y P2X, es decir, no son selectivos para un receptor en particular. Un ejemplo es el polisulfonato de suramina y sus derivados, que son antagonistas no selectivos de los receptores P2 (tabla 1), siendo un antagonismo reversible, ya que la respuesta es recuperada después de un periodo de lavado (von Kügelgen & Wetter, 2000; Abbracchio et al., 2006). Dentro de la familia P2Y, la suramina es un antagonista de los receptores P2Y2

(Wildman et al., 2003) y P2Y11 (Communi et al., 1999b); mientras que los derivados del piridoxal fosfato PPADS antagonizan los efectos de P2Y1 (Lambrecht et al., 2002)

RECEPTOR	AGONISTAS	ANTAGONISTAS
P2Y1	2-MeSADP = ADP β S> 2-MeSATP = ADP > ATP, MRS2365	MRS2179, MRS2500, MRS2279, PIT
P2Y2	UTP = ATP, UTPγS, INS 37217, INS 365	Suramina > RB2
P2Y4	UTP \geq ATP, UTPγS, INS 37217	PPADS > RB2
P2Y6	UDP > UTP >> ADP, UDPβS, IDP	RB2 > PPADS > suramina
P2Y11	AR-C67085MX > BzATP \geq ATP γ S > ATP	Suramina > RB2, NF157, 5'-AMPS
P2Y12	2-MeSADP \geq ADP >> ATP	CT50547, AR-C69931MX, INS49266, AZD6140, PSB0413, ARL66096, 2-MeSAMP
P2Y13	ADP = 2-MeSADP >> ATP=2-MeSATP	MRS2211, 2-MeSAMP
P2Y14	UDP-glucosa = UDP-galactosa	No disponibles

Tabla 1. Principales agonistas y antagonistas (en orden de potencia) de los receptores P2Y (Burnstock, 2007).

1.6 Mecanismos de señalización y acciones celulares de los receptores P2Y sensibles a nucleótidos de uridina

En el folículo ovárico de mamífero se expresa una gran cantidad de receptores sensibles a agonistas purinérgicos, particularmente los receptores sensibles a UTP y UDP (Tabla 1), ya que de acuerdo a trabajos anteriores de nuestro grupo, las células de la teca, al ser estimuladas con UTP, muestran un aumento en el Ca²⁺ intracelular, lo que sugiere la existencia de receptores sensibles a este nucleótido y, de acuerdo a los

datos farmacológicos reportados para los receptores purinérgicos (Abbracchio et al., 2006; von Kügelgen & Wetter, 2000), podrían ser los receptores P2Y2, P2Y4 y/o P2Y6, éste último sensible a UDP (Tabla 1), por lo que a continuación se da una breve descripción de las características y acciones celulares de estos tres receptores.

1.6.1 *El receptor P2Y2*

El receptor P2Y2 ha sido clonado y caracterizado en humano, rata, ratón, perro y cerdo, entre otros. Estos receptores son completamente activados por ATP y UTP, mientras que ADP y UDP son agonistas menos efectivos (Lustig et al., 1993; Parr et al., 1994; Lazarowski et al., 1995a). El UTP γ S es el agonista más potente (Lazarowski et al., 1995a) y la suramina es su principal antagonista (Charlton et al., 1996; Lambrecht et al., 2002; Wildman et al., 2003; Burnstock, 2007). Estos receptores se acoplan a la proteína G_{q/11} y al activar la PLC se sintetiza IP₃ y diacilglicerol (DAG), segundos mensajeros que liberan Ca²⁺ intracelular y activan la PKC.

Otras vías de señalización que son activadas en astrocitos de ratón por los receptores P2Y2, son la estimulación de PKC y las ERK1/2 dependientes e independientes de Ca²⁺, que a su vez pueden activar a la fosfolipasa A₂ (PLA₂) citosólica (Gendron et al., 2003; Xu et al., 2003), permitiendo la liberación de ácido araquidónico (AA), el precursor de eicosanoides, leucotrienos y prostaglandinas (Balsinde et al., 2002).

La expresión del RNAm de P2Y2 en humano se ha detectado en músculo esquelético, corazón, cerebro, bazo, linfocitos, macrófagos, médula ósea, pulmones, hígado, estómago, páncreas y muchos otros tipos celulares (Moore et al., 2001; Abbracchio et al., 2006; Burnstock, 2007). Los receptores funcionales están ampliamente distribuidos: músculo liso, epitelio, células endoteliales y leucocitos, cardiomiocitos, osteoblastos y células del SNC (Bowler et al., 1995; Ho et al., 1995; Kirischuk et al., 1995; Rice et al., 1995; Berti-Mattera et al., 1996; Kim et al., 1996; Kunapuli & Daniel, 1998; Weisman et al., 1999; Pillois et al., 2002; Seye et al., 2002; Gendron et al., 2003; Kumari et al., 2003).

La activación de los receptores P2Y2 está presente en la inducción de respuestas inflamatorias, proliferación celular, migración, adhesión e infiltración (Hutchings et al., 2003; Li et al., 2003; Pidgeon et al., 2003).

La activación de este receptor también induce la progresión del ciclo celular en células del músculo liso, de G₁ a las fases S y M (Malam-Souley et al., 1996; Miyagi et al., 1996). Así, se ha visto que la expresión de RNAm del receptor está regulada durante la diferenciación celular (Martin et al., 1997).

1.6.2 El receptor P2Y4

El receptor P2Y4 ha sido clonado y caracterizado en humano, rata, ratón, etc. (Communi et al., 1995; Nguyen et al., 1995; Stam et al., 1996; Bogdanov et al., 1998b; Webb et al., 1998; Lazarowski et al., 2001b; Suarez-Huerta et al., 2001), y es uno de los receptores P2Y que presenta afinidad al UTP, el cual es su agonista más potente (Nicholas et al., 1996; von Kügelgen & Wetter, 2000; Abbracchio et al., 2006; Burnstock, 2007). La discriminación farmacológica entre los receptores P2Y2 y P2Y4 de roedor es muy difícil, ya que ambos responden de manera muy semejante al UTP y no hay hasta la fecha antagonistas selectivos disponibles.

En cuanto al acoplamiento con alguna proteína G específica, no existe evidencia contundente de interacción entre el receptor P2Y4 y una proteína G en particular. La respuesta consistente en la producción de IP₃ a UTP es parcialmente inhibida por la toxina *Pertussis* (PTX) (Communi et al., 1996a). Sin embargo, el receptor se acopla preferentemente a G_{q/11} y complementariamente a G_{i/o}.

La distribución del receptor P2Y4 es amplia, encontrándose su RNAm del receptor en intestino, cordón umbilical, leucocitos, cardiomiocitos y pulmón humanos; mientras que en rata se expresa en corazón y cerebro, y es mayor en neonatos que en adultos (Webb et al., 1998; Cheung et al., 2003). En ratón se ha detectado en estómago, hígado e intestino (Suarez-Huerta et al., 2001).

1.6.3 El receptor P2Y6

El receptor P2Y6 ha sido clonado y caracterizado en humano, en ratón y rata, entre otros (Lazarowski et al., 2001b; Chang et al., 1995; Nicholas et al., 1996; Communi et al., 1996b), y se conoce que es sensible al UDP, por lo que se considera su principal agonista. El orden en potencia es: UDP > UTP > ADP > 2-MeSATP >> ATP (Communi et al., 1996b; Burnstock, 2007), y aunque no se conocen antagonistas competitivos disponibles, algunos derivados del aril-diisotiocianato son potentes antagonistas selectivos para P2Y6 comparado con P2Y1, 2, 4 y 11 (Mamedova et al., 2004).

Para estos receptores, tampoco existe evidencia molecular contundente de interacción con una proteína G específica. La respuesta consistente en la producción de IP₃ a UDP es insensible a PTX, sugiriendo un acoplamiento con G_{q/11} (Chang et al., 1995; Robaye et al., 1997). Aunque también hay un incremento en el AMPc mediado por P2Y6, pero es probable que sea un efecto indirecto mediado por prostaglandinas (Köttgen et al., 2003). A diferencia de otros receptores P2Y, el receptor P2Y6 se desensibiliza muy lentamente y al parecer se internaliza (Robaye et al., 1997; Brinson & Harden, 2001).

Su distribución, como la de todos los receptores P2Y, es bastante amplia, reportándose la expresión de su RNAm en pulmón, timo, placenta, intestino y leucocitos (Communi et al., 1996b) En humano y en rata se ha encontrado en pulmón, bazo, estómago, intestino y aorta (Chang et al., 1995).

2. ANTECEDENTES

En estudios previos hemos evidenciado la expresión del canal P2X7 en las células de la teca folicular y en el epitelio ovárico superficial (Juárez-Espinosa, 2006) y analizamos las respuestas celulares provocadas al activar estos receptores en células de la teca folicular de ratón; el hallazgo principal fue que el receptor P2X7 moviliza Ca^{2+} intracelular e induce apoptosis (Vázquez-Cuevas et al., 2006).

En estos estudios se registraron los cambios en Ca^{2+} intracelular inducidos por distintos agonistas purinérgicos, utilizando microscopía de fluorescencia funcional; particularmente, se observó que el UTP aumentó la concentración del ion, y sugirió la expresión de receptores P2Y sensibles a UTP en este sistema celular (Vázquez-Cuevas et al., 2006).

Dado que algunos de los receptores P2Y2 y P2Y4, que responden a UTP, pueden modular la proliferación celular (Tai et al., 2001a), proponemos que pueden tener una función en la supervivencia de las células de la teca y por lo tanto regular aspectos fisiopatológicos. El primer paso para el estudio de las acciones en la fisiología celular de estos receptores será demostrar su expresión y funcionalidad

3. JUSTIFICACIÓN

Existen evidencias de la participación de varios sistemas de neurotransmisión en la regulación de la fisiología ovárica. En particular para el sistema purinérgico se han identificado varios componentes moleculares, pero su papel fisiológico aún no se comprende con exactitud.

Estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado la expresión de diversos receptores purinérgicos en distintos tipos celulares del ovario; para profundizar en estas observaciones caracterizamos la respuesta purinérgica mediada por el receptor-canal P2X7 en las células de la teca ovárica de cerdo y ratón, como parte de este estudio realizamos experimentos farmacológicos registrando los cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} inducidos por agonistas purinérgicos. Además de detectar respuestas generadas por el receptor P2X7, encontramos que la estimulación con UTP induce también movilización de Ca^{2+} , los datos farmacológicos indican que esta respuesta podría deberse principalmente a receptores P2Y, pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. La demostración de la expresión de receptores P2Y indicaría que este tipo celular expresa al menos dos receptores con características farmacológicas y mecanismos de acción distintos y, por tanto, con acciones celulares diferenciales y finamente reguladas en las células de la teca.

El objetivo del presente estudio fue analizar la expresión de receptores P2Y sensibles a nucleótidos de uridina y proporcionar evidencia celular de que son funcionales. Los datos obtenidos han permitido ampliar nuestro conocimiento sobre el sistema purinérgico en la teca ovárica y sugieren algunas de las acciones fisiológicas mediadas por ATP independientes de los receptores P2X7.

4. HIPÓTESIS

Las células de la teca del folículo ovárico de ratón expresan receptores P2Y funcionales sensibles a nucleótidos de uridina.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar los receptores purinérgicos P2Y sensibles a nucleótidos de uridina que se expresan en células de la teca del ovario de mamífero y evidenciar su funcionalidad.

Objetivos particulares

1. Identificar los receptores purinérgicos P2Y sensibles a nucleótidos de uridina que se expresan en células de la teca de ovario de mamífero.
2. Determinar la funcionalidad de los receptores P2Y en células de la teca que fueron caracterizados molecularmente.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cultivo celular

Se establecieron cultivos primarios por digestión enzimática con colagenasa de acuerdo a procedimientos existentes en la literatura (Magoffin & Erickson, 1988).

Ratones hembra de la cepa C57-B fueron sacrificadas por dislocación cervical. Se extrajeron los ovarios y se colocaron en medio L-15, en el microscopio estereoscópico se les retiró el tejido intersticial utilizando fórceps finos. Una vez limpios se colocaron en una solución de colagenasa tipo I (300 U/ μ L) en medio M199 por 20 minutos a 37° C, posteriormente los ovarios se pasaron por una pipeta con un orificio del tamaño adecuado, para despegar mecánicamente el OSE, que fue desechado. Para eliminar la mayor parte de células de la granulosa, los ovarios sin epitelio fueron punzados con una aguja hipodérmica fina, cortados en piezas pequeñas e incubados 20 minutos en una mezcla de digestión (colagenasa 100 μ g/ μ L, DNasa I 10 mg/mL, BSA 10 mg/mL en medio M199), después se homogenizaron haciéndolos pasar por la punta de una pipeta.

De este homogenado, las células de la teca se separaron en un gradiente discontinuo de Percoll, formado por una capa de Percoll (44%), HEPES 250 mM (10%) completando con medio M199; y una capa de Percoll (3.8%, con una densidad de 1.55 g/cm³), HEPES 250 mM (10%), BSA 100 mg/mL (1%), completando con medio M199 adicionado con 150 mM de NaCl, al 85%. Posteriormente se centrifugó durante 20 minutos a 500 rpm, y se extrajo la capa de células de la teca por aspiración (Magoffin, 1988). Las células aisladas se cultivaron en medio DMEM/F12 complementado con 10% de suero fetal bovino y antibiótico-antimicótico a 37° C, con 5% de CO₂.

6.2 Transcripción reversa y PCR

El RNA total de los cultivos de células de la teca, cerebro, corazón y ovario completo se purificaron por el método de isotiocianato de guanidina (Chomczynski &

Sacchi, 1987).

A partir del RNA obtenido se sintetizó la cadena de DNA complementario (cDNA) con la transcriptasa reversa (RT), 3 µg de RNA pretratado con DNasa I, oligodT y oligonucleótidos hexaméricos al azar como cebadores, en un volumen total de 30 µL.

El cDNA sirvió como templado en reacciones de PCR donde utilizamos oligonucleótidos específicos que nos permitieron obtener amplificadas de los receptores P2Y de interés, y de los transcritos control de β-actina, CYP11A y el receptor de la FSH. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados y las condiciones de amplificación se enlistan en la siguiente tabla:

OLIGOS	SECUENCIA	PROTOCOLO DE PCR
p2y2 fwd	TGCTGGTGCTGGCCTGCCAGGCAC	30 ciclos (desnaturalización a 94° C por 45 seg, alineamiento a 55° C por 45 seg y extensión a 72° C por 45 seg)
p2y2 rev	GCCCTGCCAGGAAGTAGAGTACCG	
p2y4 fwd	ACTAGGTCCCAGCCCAAGTT	35 ciclos (desnaturalización a 94° C por 45 seg, alineamiento a 58° C por 1:30 min y extensión a 72° C por 45 seg)
p2y4 rev	GCACCATGATTGTGGAAGCTG	
p2y6 fwd	TTTCAAGCGACTGCTGCTAA	30 ciclos (desnaturalización a 94° C por 45 seg, alineamiento a 55° C por 45 seg y extensión a 72° C por 45 seg)
p2y6 rev	TGGCATAGAAGAGGAAGCTAA	

OLIGO	SECUENCIA	PROTOCOLO DE PCR
cyp11a fwd	GCTGGAAGGTGTAGCTCAGG	30 ciclos (desnaturalización a 94° C por 45 seg, alineamiento a 55° C por 45 seg y extensión a 72° C por 45 seg)
cyp11a rev	CACTGGTGTGGAACATCTGG	
FSHr fwd	TGGATGTCATCACTGGCTGT	30 ciclos (desnaturalización a 94° C por 45 seg, alineamiento a 54° C por 45 seg y extensión a 72° C por 45 seg)
FSHr rev	CAAATCTCAGTTCAATGGCG	
β-actina fwd	GGGTCAGAAGGATTCCTATG	25 ciclos (desnaturalización a 94° C por 45 seg, alineamiento a 55° C por 45 seg y extensión a 72° C por 45 seg)
β-actina rev	GGTCTCAAACATGATCTGGG	

Tabla 2: Protocolo de PCR utilizado para amplificar los transcritos de los receptores P2Y2, P2Y4 y P2Y6, así como controles, los cuales fueron los transcritos de CYP11A, del receptor de la FSH y de la β-actina. También se muestra la secuencia de los oligonucleótidos (*forward* y *reverse*) utilizados en cada reacción.

Los amplificadores obtenidos fueron clonados en el vector pCR4-TOPO (Invitrogen) por ligación directa del fragmento de PCR, y secuenciados con oligonucleótidos *M13Forward*. Las secuencias se analizaron en el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), que compara la secuencia problema con todas las secuencias conocidas de la base de datos del NCBI para así corroborar su identidad.

6.3 Registro de la concentración de Ca²⁺ intracelular

Las células de la teca del ovario de ratón se cultivaron en cubreobjetos de 12 mm. Los cultivos con confluencia del 90% se cargaron con 5 μM de Fluo-4 AM (Molecular Probes) y 0.1% de ácido plurónico en solución Krebs (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 20 minutos. Posteriormente se lavaron 7 minutos en la misma solución y colocados 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 Ca²⁺ intracelular al incubar con agonistas (ATP, UTP y UDP) y antagonistas (suramina) de los receptores P2Y, se registraron cada 100 ms por fotografías con un objetivo seco 20X (Mason et al., 1993). Las secuencias de obtuvieron con *Image-Pro Plus* (Media cybernetics) y procesadas en el programa *Imágenes* (desarrollado por el Dr. Ivan Terol CIDETEQ, SEP-CONACYT, México).

6.4 Inmunocitoquímica

Las células de la teca se cultivaron en cubreobjetos de la manera descrita previamente. Los cultivos con 90% de confluencia fueron fijados en paraformaldehído al 4% por 25 minutos y lavados con PBS 1X. Los aldehídos fueron neutralizados incubando en NH₄Cl-PBS 50 mM por 10 minutos dos veces. Se permeabilizó incubando con acetona absoluta fría durante 5 minutos. La muestra se bloqueó con una mezcla de PBS-BSA al 1% y se lavó 3 veces con PBS 1X; posteriormente se incubó con un anticuerpo anti-CYP11A a una dilución de 1:300 en solución de bloqueo durante toda la noche a 4° C en agitación, en el protocolo del experimento se incluyeron controles sin anticuerpo primario.

Posteriormente se realizaron lavados con PBS 1X y se incubaron por dos horas a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo dirigido contra la IgG de ratón, el cual está acoplado a isocianato de fluoresceína (FITC) en una dilución 1:2000. Después de incubar con el anticuerpo secundario, se marcó el núcleo con yoduro de propidio (IP), el cual se preparó 1:1000 en PBS 1X con 5 µL de RNasa A. Se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente, en la oscuridad, y se realizaron lavados con PBS 1X. Se montaron en *VectaShield* y se sellaron con barniz transparente. Las preparaciones fueron analizadas en un microscopio confocal *LSM 519 Meta* (Zeiss).

7. RESULTADOS

7.1 Cultivo de células de la teca

La etapa inicial del presente trabajo fue estandarizar el método de obtención de células de la teca, por el gradiente de Percoll (Magoffin, 1988). La pureza de los cultivos se evaluó morfológicamente y por marcadores específicos de las células de la teca.

En la figura 5 se muestra una imagen de las células de la teca en cultivo, donde se observa la morfología característica (similar a fibroblastos).

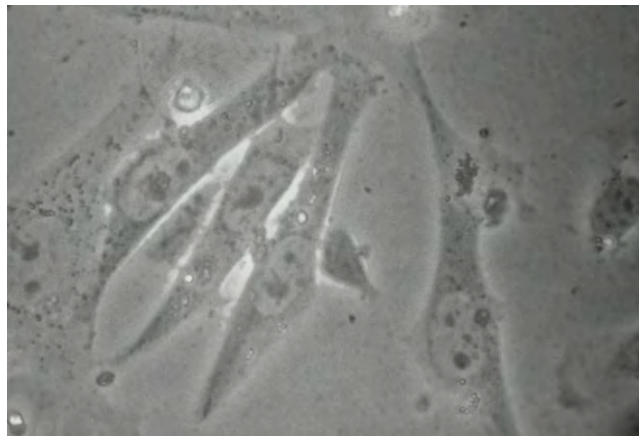


Figura 5. Cultivo de células de la teca en medio DMEM/SFB 10% con 72 hrs de cultivo (40X).

Para evaluar la expresión de marcadores se utilizaron dos estrategias: RT-PCR para amplificar los transcritos de CYP11A, CYP17A y StAR; estas tres enzimas forman parte de la maquinaria de biosíntesis de andrógenos (Knobil & Neill, 1994); el transcrito del receptor a FSH (*fshr*), el cual se encuentra sólo en células de la granulosa y no en células de la teca (Fujita et al., 1981), y el transcrito de una proteína constitutiva, la β -actina. Para obtener resultados confiables por RT-PCR, fue necesario comprobar la integridad del RNA utilizado en la reacción de retrotranscripción; en la figura 6 se muestra una electroforesis de RNA en un gel de agarosa.

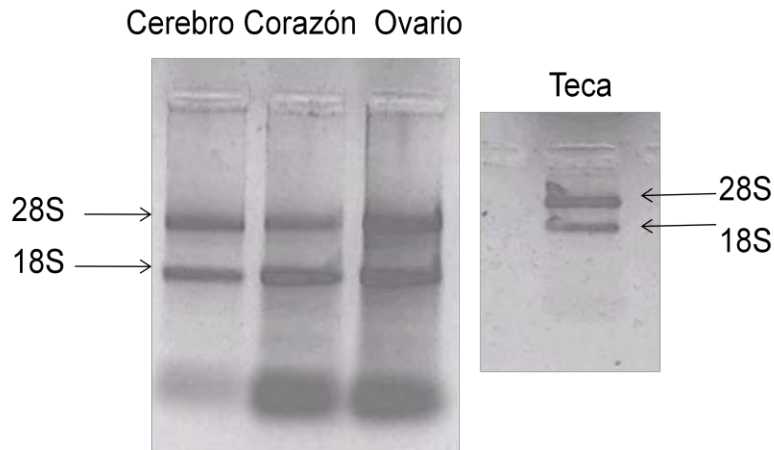


Figura 6. Gel de agarosa-formaldehído al 1% en el que se observan las bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S del RNA extraído por el método de isotiocianato de guanidina, de cerebro, corazón, ovario y cultivo de las células de la teca de ratón.

La figura anterior corresponde a un gel de agarosa-formaldehído al 1% donde se corrieron las muestras de RNA extraídas de los diferentes tejidos, donde el primer gel contiene las muestras control: cerebro, corazón y ovario completo; y el segundo gel contiene RNA de los cultivos de teca. En ellos, se puede observar la separación del RNA ribosomal, específicamente las subunidades 18S y 28S, ya que el RNAm no es detectable por este método, por lo que la definición de las bandas del RNA ribosomal indica que la muestra de RNA no está degradada y es de buena calidad y adecuada para la reacción de retrotranscripción.

Otro parámetro para determinar la calidad del RNA fue el cociente de absorbancia 260/280 nm, debido a que en esta región del espectro (región ultravioleta), hay una máxima absorción de los ácidos nucleicos, específicamente a 260 nm, la cual es debida a los grupos aromáticos en las bases nitrogenadas. El cociente 260/280 nm permite establecer el grado de pureza de la muestra, principalmente de moléculas orgánicas que hayan participado en el proceso de extracción de RNA (como el fenol o cloroformo) o incluso de proteínas que no hayan sido separadas de forma adecuada (las cuales absorben a 280 nm); cuando este valor es 2.0 o muy cercano a éste, la muestra está prácticamente libre de impurezas y, por lo tanto, adecuado para la reacción de retrotranscripción. Las muestras de RNA utilizadas para la síntesis de

cDNA tuvieron los siguientes promedios en los cocientes 260/280 nm: 1.62 para el RNA de teca; 1.69 para el RNA de ovario completo; 1.63 para el RNA de corazón y 1.88 para el RNA de cerebro.

Estas muestras de RNA fueron utilizadas para la síntesis del cDNA, como se detalla en "materiales y métodos" y se realizaron las amplificaciones con los oligonucleótidos específicos para el transcrito de CYP11A, un marcador específico de las células de la teca y del receptor a FSH (*fshr*) utilizado para descartar contaminación con células de la granulosa, las bandas correspondientes a las amplificaciones se muestran en la figura 7.

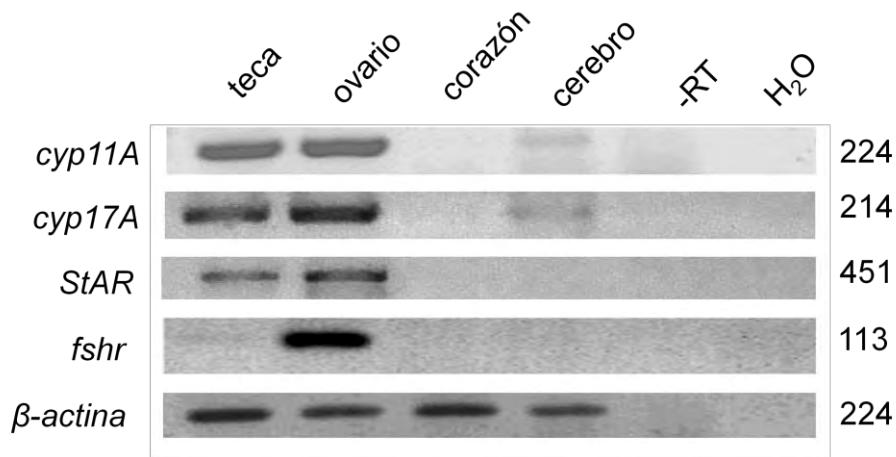


Figura 7. Productos de amplificación por PCR de los transcritos correspondientes a *cyp11a*, *cyp17a*, *StAR*, *fshr* y β -actina. Los carriles de -RT (RNA de teca sin la enzima RT) y H₂O corresponden a los controles de cada amplificación. La columna de la derecha corresponde a los pesos moleculares de las bandas (en pb).

El cDNA de las células de la teca fue positivo para el transcrito de la enzima CYP11A, CYP17A y StAR; el amplificado del transcrito de FSHr fue detectado en el cDNA de ovario completo pero no en el cDNA de células de la teca, lo que sugiere fuertemente que la presencia de células de la granulosa es marginal, ya que FSHr es un marcador específico para este tipo celular. La β -actina fue usada como control constitutivo.

Por inmunocitoquímica, también se observó la expresión de CYP11A. Como se ve en la figura 8 al menos 95% de las células mostraron marcaje positivo a CYP11A.

De esta manera, junto con los resultados obtenidos por RT-PCR, fue posible corroborar que las células aisladas son principalmente tecales.

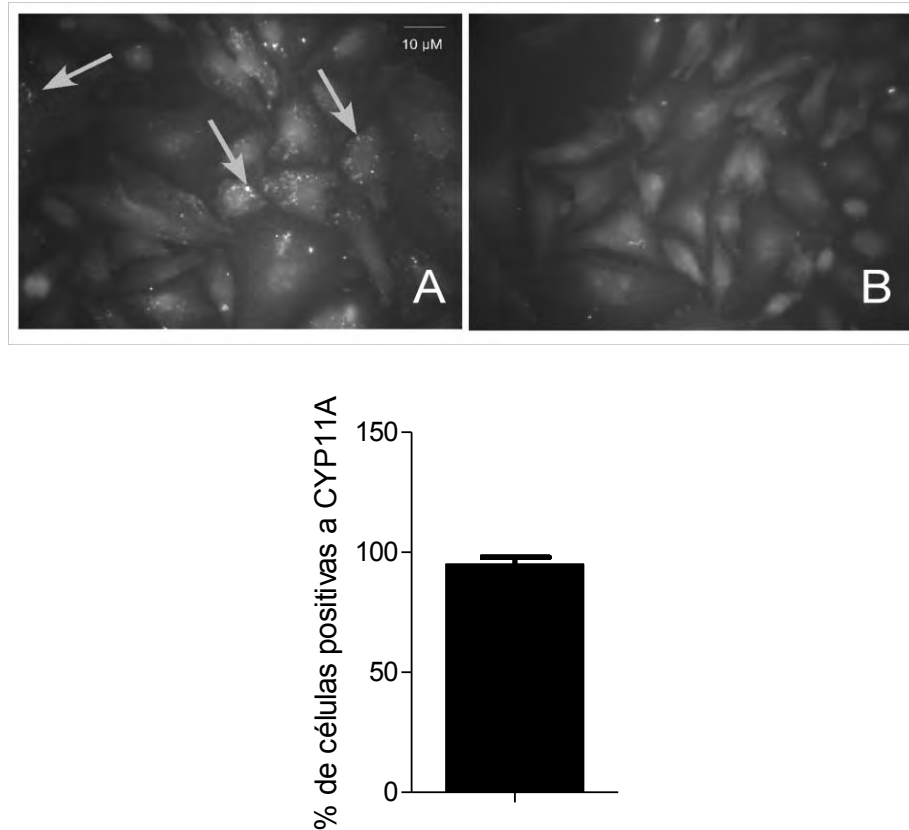


Figura 8. Distribución de la proteína CYP11A en células de la teca de ratón, detectada por fluorescencia en microscopía. A) Marcaje de la proteína CYP11A con anti-CYP policlonal 1:300 y anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a FITC 1:2000, en un objetivo 100X y tinción de núcleo con yoduro de propidio (IP). B) Control sin anticuerpo primario, tinción de núcleo con IP, en un objetivo 100X.

7.2 Identificación de los transcritos de los receptores P2Y2, P2Y4 y P2Y6 en células de la teca

Basados en los antecedentes directos del presente trabajo, nuestro siguiente objetivo fue detectar la expresión de los receptores P2Y2, P2Y4 y/o P2Y6 en células de la teca del ovario de ratón, para lo cual se realizó la amplificación de un fragmento del

transcrito de cada receptor por RT y PCR utilizando oligonucleótidos específicos.

De esta manera se pudo detectar el RNAm de los receptores P2Y2 y P2Y6, obteniendo fragmentos de 1032 y 257 pb, respectivamente, los esperados de acuerdo al diseño de los oligonucleótidos. El amplificado para el receptor P2Y4, no se detectó en el cDNA de células de la teca. Para confirmar esta observación se usaron 2 pares diferentes de oligonucleótidos y las reacciones se extendieron hasta 40 ciclos para descartar cualquier artefacto que pudiera interferir en los resultados observados; sin embargo, con ambos pares de oligonucleótidos y cambiando las condiciones de amplificación se obtuvo el mismo resultado: la ausencia de la expresión del RNAm de P2Y4 en teca. En los tejidos control, el ovario completo y el cerebro, se comprobó la expresión de *p2y2r*, *p2y4r* y *p2y6r* mientras que en corazón se observó la expresión de *p2y2r* y *p2y6r* (Figura 9). Como transcrito constitutivo se amplificó β -actina.

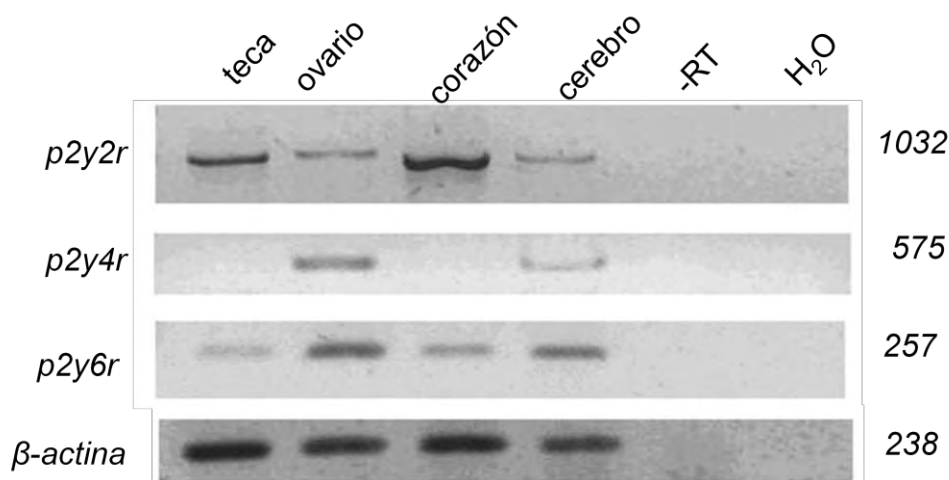


Figura 9. Fragmentos de amplificación por PCR de los transcritos de P2Y2, P2Y4 y P2Y6 en cDNAs de teca, ovario, corazón y cerebro y β -actina como control constitutivo. Los carriles de -RT y H₂O (como templado se utilizó RNA de teca sin la enzima RT o agua, respectivamente). La columna de la derecha corresponde al peso molecular de las bandas obtenidas (en pb).

Las bandas obtenidas por RT-PCR en la figura anterior corresponden al tamaño esperado, fueron purificadas y clonadas en el vector pCR4-TOPO y secuenciados con el oligonucleótido *M13Forward*, con el fin de corroborar su identidad, al comparar la secuencia obtenida con las almacenadas en la base de datos del NCBI, mediante el

programa BLAST, obteniéndose una identidad del 100% con la secuencia reportada previamente, para los fragmentos de p2y2r (NM008773) y p2y6r (NM183164) en células de la teca y ovario, y para p2y4r (NM020621) en ovario completo.

7.3 Caracterización farmacológica de los receptores P2Y por microscopía de fluorescencia funcional

Con el fin de profundizar en los resultados obtenidos en las ampliaciones de los transcritos de los receptores, se realizó un ensayo funcional para monitorear el cambio de la concentración intracelular de Ca^{2+} en respuesta al estímulo con agonistas purinérgicos por microscopía de fluorescencia funcional en células cargadas con el indicador fluorescente Fluo-4, como se describe en “materiales y métodos”. Un ejemplo de estos registros se muestra en la figura 10 donde se observan imágenes representativas de células de la teca estimuladas con UTP.

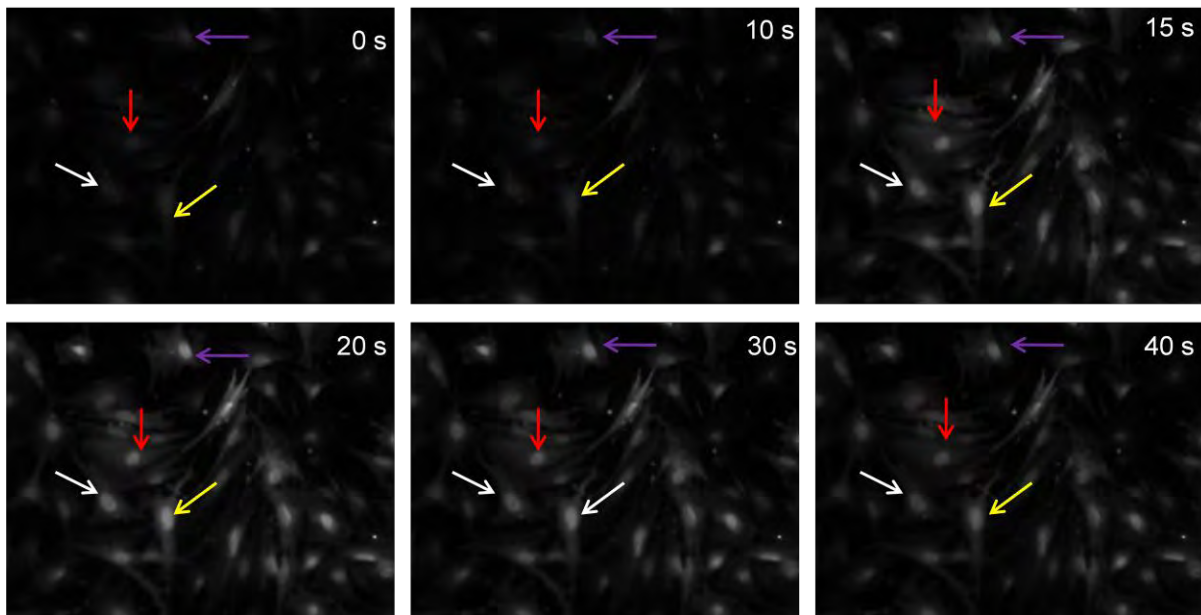


Figura 10. Secuencia de imágenes correspondientes a la respuesta de células de la teca cargadas con Fluo-4, estimuladas con UTP 100 μM , observadas en diferentes tiempos de estimulación (en segundos). Cada color de flecha muestra el aumento de fluorescencia de una célula específica durante el tiempo de estimulación. El agonista se aplicó a los 10 segundos.

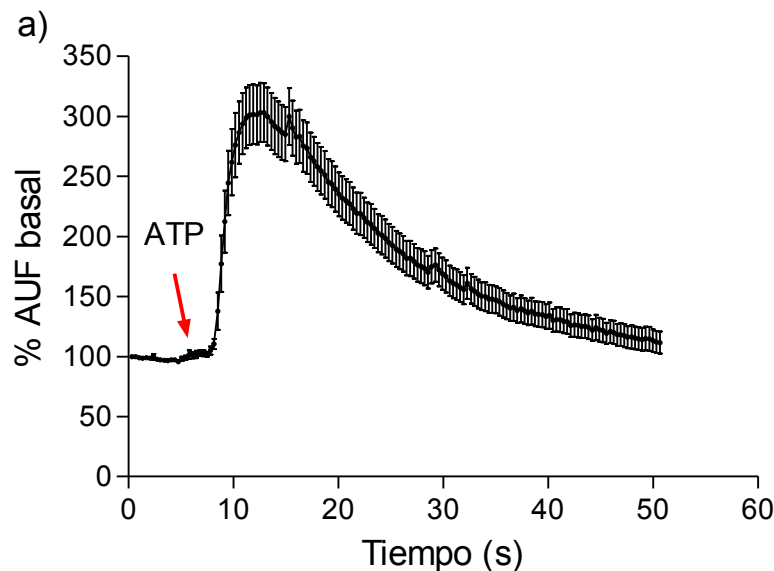
Estos experimentos se diseñaron para generar información farmacológica que, analizada en conjunto con las evidencias moleculares, permitieran conocer la identidad de los receptores expresados en las células de la teca. Así, se construyeron curvas concentración-respuesta a ATP, UTP y UDP, y una curva de inhibición de la respuesta a UTP con el antagonista suramina.

7.3.1 Respuesta de las células de la teca a ATP

El estímulo de células de la teca por ATP indujo un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular (Figura 11). Las respuestas registradas fueron transitorias, alcanzando el máximo en segundos después de la estimulación y una rápida disminución hasta el nivel basal; un trazo representativo de la respuesta inducida por 100 μM de ATP es mostrado en la figura 11a.

Los valores máximos detectados para cada concentración se utilizaron para la construcción de una curva concentración-respuesta; los datos se ajustaron a una curva de Hill (Graph Pad Prism) para obtener la concentración media (EC_{50}) (Figura 11b).

Como puede observarse, existió aumento dependiente de la concentración en la fluorescencia basal, alcanzando su máximo con 10-100 μM de ATP. El análisis de esta curva generó una EC_{50} de $1.32 \pm 0.6 \mu\text{M}$.



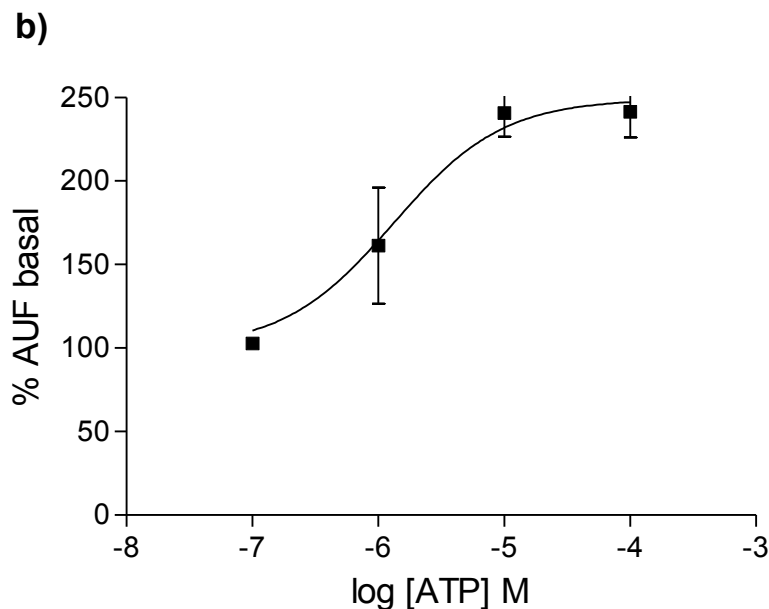


Figura 11. Registro del aumento de $[Ca^{2+}]_i$ generado por ATP. a) Respuesta representativa de una población de células de la teca en cultivo ($n=10$ células) estimuladas con ATP $100 \mu\text{M}$. La flecha muestra el momento en el que comienza la perfusión de ATP, obteniendo una respuesta máxima alrededor de los 15-20 segundos de iniciado el registro. b) Curva concentración-respuesta, obtenida por análisis del aumento de la fluorescencia aplicando distintas concentraciones de ATP ($n=5$ experimentos, 50 células).

7.3.2 Respuesta de las células de la teca a UTP

El UTP es un agonista muy potente de los receptores P2Y2; en sistemas de expresión exógena la EC_{50} reportada es de $0.14 \mu\text{M}$; en cambio es poco potente para los receptores P2Y6, ya que se ha reportado en sistemas de expresión exógena, una EC_{50} de $6 \mu\text{M}$, casi 50 veces mayor que para P2Y2 (Abbraccio et al., 2006).

Al igual que el ATP, la estimulación por UTP indujo una respuesta transitoria, un trazo representativo a $100 \mu\text{M}$ de UTP se ilustra en la figura 12a. La EC_{50} obtenida fue de $1.15 \pm 0.82 \mu\text{M}$, relativamente menor que la observada para ATP. El valor de fluorescencia (AUF) máximo obtenido con este agonista en las células de la teca fue de 289.5% del basal (Figura 12b).

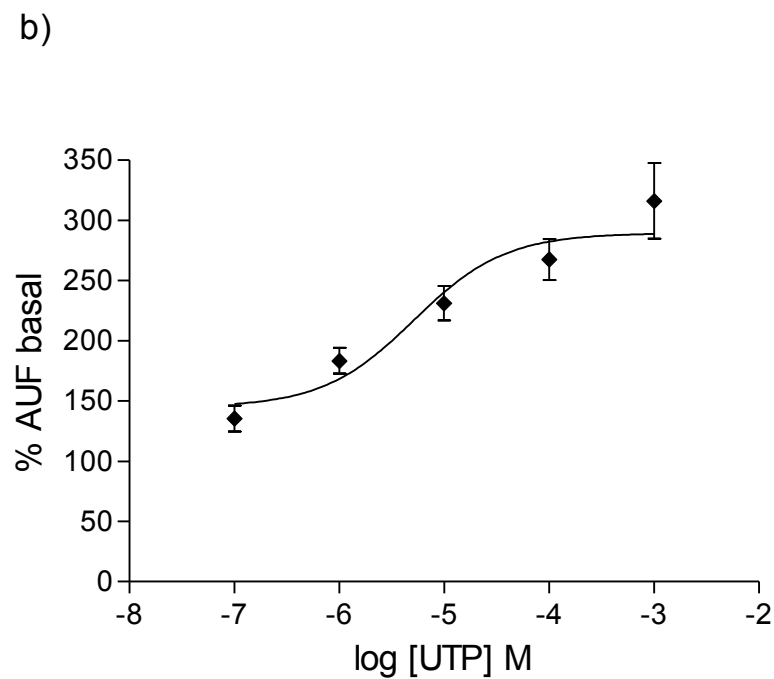
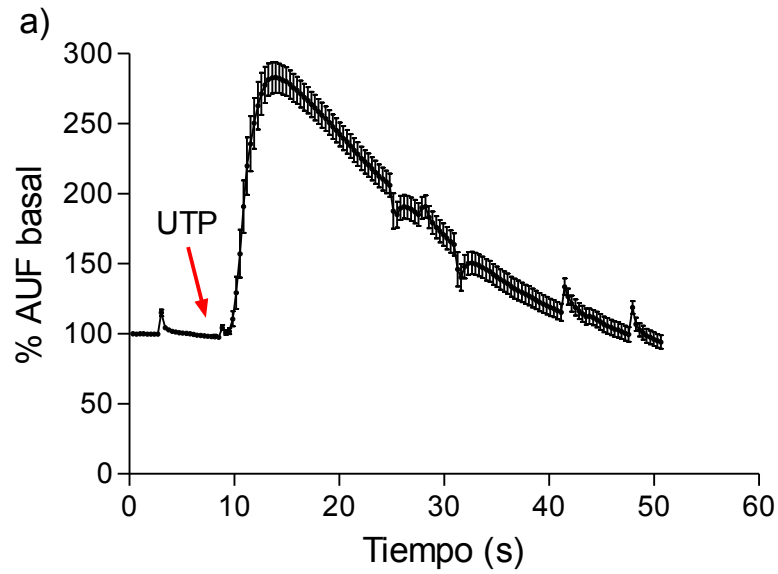
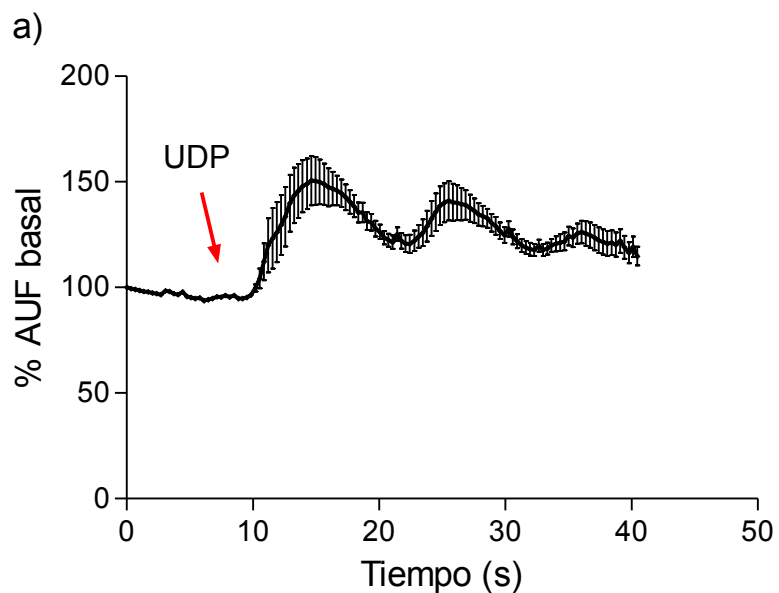


Figura 12. Registro del aumento de $[Ca^{2+}]_i$ provocado por UTP. a) Respuesta representativa de una población de células de la teca en cultivo ($n=10$ células) estimuladas con UTP $100 \mu\text{M}$. La flecha muestra el momento en el que comienza la perfusión de UTP, obteniendo una respuesta máxima alrededor de los 15-20 segundos de iniciada la perfusión. b) Curva concentración-respuesta, obtenida por análisis del aumento de la fluorescencia aplicando distintas concentraciones de UTP ($n=10$ experimentos, 100 células).

7.3.3 Respuesta de las células de la teca a UDP

Se utilizó otro agonista de los receptores purinérgicos sensibles a nucleótidos de uridina, el UDP. El fármaco activa al receptor P2Y6, aunque éste también responde a concentraciones elevadas de UTP y ATP (Burnstock, 2007).

La estimulación con 100 μM de UDP, a diferencia de la respuesta transitoria observada con ATP y UTP, generó pequeñas oscilaciones en la concentración intracelular de Ca^{2+} (figura 13a). La curva dosis-respuesta no pudo ajustarse a la ecuación de Hill, y claramente la respuesta desencadenada por la estimulación con este agonista es muy débil en comparación con lo observado con UTP y ATP, tal como puede apreciarse en la figura 13b.



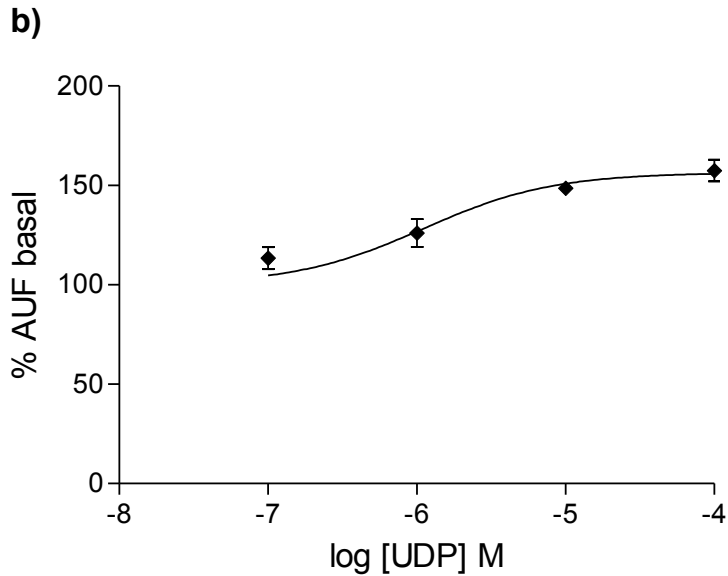


Figura 13. Registro del aumento de $[Ca^{2+}]_i$ provocada por UDP. a) Respuesta representativa de una población de células de la teca en cultivo ($n=10$ células) estimuladas con UDP $100 \mu\text{M}$. La flecha señala el momento en el que comienza la perfusión de las células con el UDP, obteniendo una respuesta máxima alrededor de los 15-20 segundos de iniciada la perfusión. b) Curva concentración-respuesta, obtenida por análisis del aumento de la fluorescencia aplicando concentraciones crecientes de UDP ($n=7$ experimentos, 70 células).

7.3.4 Curva de inhibición con suramina

Para continuar el estudio farmacológico construyó una curva de inhibición de la respuesta a UTP $10 \mu\text{M}$ con suramina, que es un antagonista no selectivo de los receptores P2Y y P2X. Se sabe que el receptor P2Y2 es muy sensible a suramina y que el receptor P2Y6 es prácticamente insensible (Abbracchio et al., 2006; von Kügelgen & Wetter, 2000). La curva de inhibición obtenida se muestra en la figura 14.

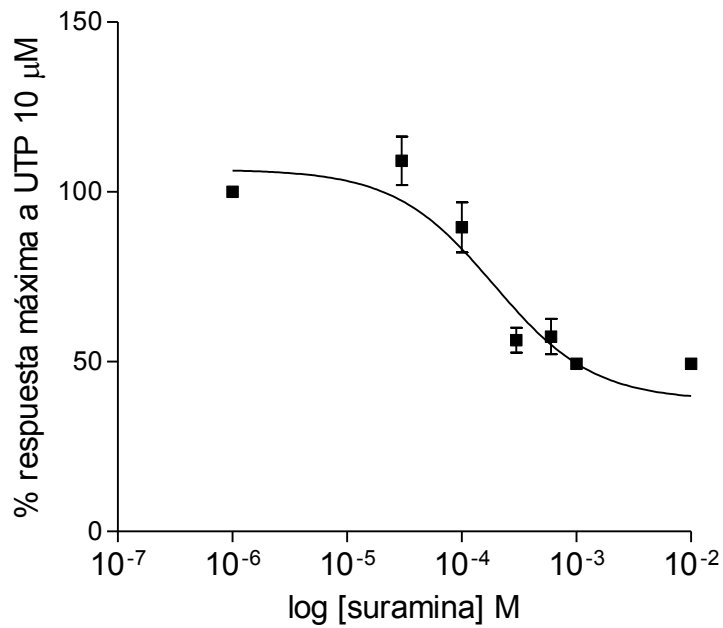


Figura 14. Curva de inhibición utilizando UTP 10 μM y diferentes concentraciones de suramina.

En este experimento se observó que la suramina por sí misma no indujo respuesta alguna; sin embargo, la droga inhibió la respuesta a UTP en aproximadamente 50% con un IC_{50} aparente de $191 \pm 0.74 \mu\text{M}$. Como la inhibición fue parcial es probable que la respuesta de Ca^{2+} al UTP haya participado al menos otro receptor insensible a suramina.

8. DISCUSIÓN

Además del control neuroendocrino ejercido por las gonadotropinas en la foliculogénesis de los mamíferos (Cotecchia et al., 1998; Armstrong & Webb, 1997; Mayerhofer et al., 1997; Dyer & Erickson, 1985), se ha demostrado que varios transmisores químicos regulan aspectos de la fisiología ovárica, y particularmente de los diferentes tipos celulares que conforman al folículo.

Existen evidencias de la expresión funcional de receptores a varios transmisores como la acetilcolina, la dopamina y el ATP, y su participación en diversos aspectos de la fisiología celular en células de la granulosa luteinizadas, por ejemplo, en la modulación de la biosíntesis de hormonas esteroideas (Mayerhofer & Fritz, 2002; Rey-Ares et al., 2007; Tai et al., 2000). Algunos de los efectos fisiológicos observados en modelos de denervación quirúrgica o química involucran varios transmisores actuando sincrónicamente, por ejemplo, se sabe que las terminales simpáticas coliberan ATP y norepinefrina (Westfall, 2002; Burnstock 2010). Sin embargo, la comunicación purinérgica y sus acciones fisiológicas en los distintos tipos celulares que conforman al ovario no ha sido estudiada con detalle, el presente trabajo explora la expresión de componentes moleculares de este sistema de comunicación celular y su funcionalidad.

Previamente, demostramos que al estimular con UTP cultivos primarios de células de la teca, éstas responden con un aumento en la concentración intracelular del ion calcio ($[Ca^{2+}]_i$); por lo que, en el presente estudio nos propusimos identificar molecularmente la expresión de receptores P2Y sensibles a nucleótidos de uridina, P2Y2, P2Y4 y P2Y6 (Burnstock, 2007; von Kügelgen & Wetter, 2000), los cuales están relacionados con una amplia gama de acciones fisiológicas como: angiogénesis, respuestas inflamatorias, proliferación celular, migración, adhesión e infiltración, secreción epitelial de cloro, quimiotaxis, activación de corrientes iónicas, entre otras (Abbracchio et al., 2006).

El trabajo se centró en el establecer cultivos primarios de células de la teca de ratón, y se usó la disgregación enzimática con colagenasa y centrifugación diferencial en un gradiente discontinuo de Percoll (Magoffin & Erickson, 1988). Este método permite el aislamiento diferencial de células sanguíneas, células de la teca y células de

la granulosa.

Para caracterizarlas molecularmente se amplificaron marcadores específicos. Las células de la teca son esteroidogénicas, específicamente androgénicas (Tajima et al., 2007); como consecuencia de la estimulación con LH son capaces de sintetizar androstenediona y DHEA a partir de colesterol (Ericksson et al., 1985; Hillier, 1994; Magoffin, 2004; Alviggi et al., 2006). La maquinaria enzimática para este proceso está bien definida (Figura 3). Particularmente, se conocen las principales enzimas que participan en la síntesis de los andrógenos en las células de la teca, las cuales son: CYP11A, CYP17A y StAR (Strauss et al., 1981; Farkash et al., 1986; Magoffin, 2005). El análisis por RT-PCR evidenció que los cultivos celulares utilizados expresan los transcritos para estas enzimas (Figura 7).

La función de las células de la teca y de la granulosa es regulada por las gonadotropinas hipofisiarias, específicamente las células de la teca son estimuladas por la LH (Richards et al., 1986; Magoffin, 1989), mientras que las células de la granulosa completan el proceso de aromatización de los andrógenos, por acción de la FSH. La expresión del receptor a FSH es exclusiva de las células de la granulosa y no está presente en las células de la teca (Fujita et al., 1981). El análisis de la expresión de esta molécula por RT-PCR mostró que el cultivo no expresa el transcrito del receptor a la FSH (Figura 7), de este modo podemos estimar que la presencia de células de la granulosa es marginal. Por inmunocitoquímica, fue analizada la expresión y distribución de la enzima esteroidogénica CYP11A (Figura 8), la cual marcó específicamente al menos 95% de las células purificadas. En conjunto, todos estos resultados apoyan fuertemente el hecho de que los cultivos celulares obtenidos están constituidos mayoritariamente por células de la teca.

La amplificación de los transcritos de los receptores purinérgicos sensibles a nucleótidos de uridina se llevó a cabo de acuerdo a las secuencias reportadas en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) de los EUA (P2Y2R: NM008773; P2Y4R: NM020621 y P2Y6R: NM183168); se diseñaron oligonucleótidos específicos de un fragmento de la secuencia codificante del RNA de los receptores P2Y2, P2Y4 y P2Y6. Como controles se utilizaron cDNAs de ovario, corazón y cerebro, ya que existen reportes que indican la expresión del transcrito de los

receptores en estos tejidos (Moore et al., 2001). Como control negativo se utilizó el RNA total de células de la teca antes de la reacción de transcripción reversa (Figura 9). Con esta estrategia detectamos la expresión de los RNAm de los receptores P2Y2 y P2Y6 en células de la teca.

En el caso del transcrito del receptor P2Y4, ha sido reportada su expresión tanto en corazón como en cerebro, sin embargo, varios estudios han mostrado que la expresión es mayor durante el desarrollo, y que ésta disminuye con la edad (Webb et al., 1998; Cheung et al., 2003). En los experimentos de este trabajo se muestra que el transcrito del receptor P2Y4 no se expresa en células de la teca (Figura 9).

Se ha establecido que los receptores purinérgicos P2Y2 y P2Y6 se acoplan a proteínas $G\alpha_q$, y al recambio de fosfoinosítidos- Ca^{2+} . Con el fin de explorar la funcionalidad de los receptores P2Y2 y P2Y6, caracterizados por RT-PCR, estudiamos estos cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular inducida por agonistas selectivos; para esto utilizamos microscopía de fluorescencia funcional, en células cargadas con el indicador de Ca^{2+} Fluo-4.

Primero construimos una curva concentración-respuesta a ATP, obteniendo un valor máximo de % de AUF de 303.27 ± 125.86 y una EC_{50} de $1.32 \pm 0.6 \mu M$. Utilizando este agonista no es posible discernir cuál de los receptores purinérgicos que se expresan en este sistema está induciendo la respuesta (Figura 11). De acuerdo con los datos farmacológicos disponibles, el receptor P2Y2 tiene como agonista más potente y selectivo al UTP, por otra parte el UDP activa principalmente a los receptores P2Y6. El UTP es 100 veces más potente para P2Y2 que para P2Y6 (Nicholas et al., 1996). En trabajos previos se ha establecido que la EC_{50} para UTP sobre receptores P2Y2 expresados exógenamente en la línea celular 1321N1 de astrocitoma es de $0.14 \mu M$ (Lazarowski et al., 1995), evaluando la producción de IP_3 en este sistema. Nuestro análisis dio un valor máximo de 283.02 ± 98.19 % de AUF y una EC_{50} de $1.15 \pm 0.82 \mu M$ para UTP (Figura 12).

Para completar estas observaciones realizamos registros de la concentración de Ca^{2+} intracelular utilizando UDP (Figura 13); este nucleótido es un agonista muy potente para los receptores P2Y6. En trabajos previos, utilizando células 1321N1 y evaluando la producción de IP_3 , se determinó que la EC_{50} para UDP, vía receptores P2Y6 es de 300

nM (Communi et al., 1996b). En nuestro análisis, el UDP aumentó muy poco la concentración de Ca^{2+}_i , siendo una respuesta muy débil en comparación con UTP y ATP, con un valor máximo de % de AUF de 126.73 ± 146.26 . Tomando en cuenta estos resultados y considerando que en nuestro trabajo se evaluó una respuesta generada por receptores nativos, lo que puede generar algunas diferencias con respecto a los EC_{50} reportados en células transfectadas, los datos apoyan la idea que la respuesta en las células de la teca fue mediada por los receptores P2Y2, ya que son prácticamente insensibles a UDP y presentaron una respuesta mayor a UTP comparada a la provocada por el ATP, lo que se concluye observando la amplitud de la respuesta desencadenada por estos agonistas.

Por otra parte, en ensayos con antagonistas de receptores purinérgicos, se observó que la estimulación con UTP se abatió con el antagonista suramina, sin embargo, la respuesta aún en concentraciones muy elevadas no desaparece por completo, observándose un remanente del 50% (Figura 14).

Dada la sensibilidad al UTP y al ATP, así como por la inhibición parcial provocada por suramina, al menos de forma parcial, sugerimos que la respuesta de las células tecales se debe de forma principal a la activación de receptores P2Y2. Es importante destacar que la diferencia esencial en la sensibilidad a suramina con la reportada en otros sistemas, puede ser debida a que en el sistema nativo utilizado se presente alguna variación o modulación de las características farmacológicas del receptor en cuanto a su sensibilidad al antagonista. También, de forma alternativa, no se descarta la participación de otro receptor purinérgico que pudiera intervenir en la respuesta de las células tecales, la característica esencial de este receptor es que presentaría sensibilidad a UTP mayor que al ATP pero insensible a suramina, pero un receptor de estas características no ha sido reportado hasta ahora. Una última posibilidad es que las diferencias observadas se expliquen por interacción entre los receptores expresados, tal y como han sido reportadas en otros modelos celulares, y que esto provoque cambios en las características de los receptores involucrados. Una de las propuestas a este respecto es construir una curva de inhibición con otro antagonista, más específico en el bloqueo de receptores P2Y6, por ejemplo el reactivo azul 2 (RB2) o el PPADS, ya que estos antagonistas no bloquean la respuesta de los

receptores P2Y2 y, en el caso del RB2 sí está reportado como un antagonista muy potente para los receptores P2Y6, ya que induce una inhibición del 100% a 100 μ M (von Kügelgen & Wetter, 2000), pudiendo de esta manera distinguir las respuestas farmacológicas de ambos receptores.

En resumen, los datos moleculares y farmacológicos presentados en este trabajo muestran la expresión de los receptores P2Y2 y P2Y6 en las células de la teca del folículo ovárico. Los datos obtenidos a través de experimentos funcionales muestran que la respuesta del aumento de Ca^{2+} intracelular depende principalmente de la activación de los receptores P2Y2.

Una de las implicaciones fisiológicas de la acción de los receptores P2Y2 es la regulación de la proliferación celular (Burnstock, 2006), recientemente nuestro grupo de trabajo ha mostrado que la estimulación de cultivos primarios de células de la teca con UTP induce proliferación celular, por una vía que involucra la actividad de una isoforma de la PKC dependiente de Ca^{2+} y de las MAPK ERK 1/ 2 (Vázquez-Cuevas et al., 2010). La regulación de la proliferación celular puede tener relevancia fisiopatológica en el ovario, por ejemplo: 1) en el síndrome del ovario poliquístico, la teca folicular experimenta hipertrofia e hiperplasia y consecuentemente una sobreproducción de andrógenos, en este caso la comunicación celular purinérgica puede estar participando en los procesos que inducen y/o mantienen esta condición patológica y, por lo tanto, representar un blanco terapéutico potencial o 2) ya que la teca aparece bien diferenciada desde el estadio de folículo secundario (Magoffin, 2005), la regulación de la proliferación celular ejercido por el sistema purinérgico puede estar modulando de manera diferencial las etapas tardías de la foliculogénesis, posiblemente modulando las acciones de las gonadotropinas.

Los receptores purinérgicos y su potencialidad como moduladores de la fisiología de las células de la teca representan nuevos blancos terapéuticos cuyas propiedades farmacológicas en condiciones fisiológicas deben ser evaluadas. La información descrita en el presente trabajo es el primer reporte de la expresión y funcionalidad de receptores sensibles a nucleótidos de uridina (UTP/UDP), específicamente de los receptores P2Y2 y P2Y6 en células de la teca de ovario de mamíferos.

9. CONCLUSIONES

1. Las células de la teca de ovario de ratón expresan los transcritos de los receptores P2Y2 y P2Y6.
2. Los resultados obtenidos mediante el registro de Ca^{2+} intracelular, muestran que el ATP y el UTP inducen una respuesta específica en las células de la teca, consistente en la movilización del Ca^{2+} intracelular. Esto demuestra la expresión funcional de receptores del tipo P2Y en este tipo celular; el orden de potencia para los agonistas estudiados fue: $\text{UTP} = \text{ATP} > \text{UDP}$. La amplitud de la respuesta fue mayor para UTP que para ATP.
3. La respuesta a 10 μM de UTP es mediada por receptores parcialmente sensibles a suramina. De acuerdo con los datos moleculares y farmacológicos los receptores principalmente involucrados fueron del tipo P2Y2. Sin embargo, debido al efecto parcial de suramina sobre la respuesta, la participación marginal de receptores P2Y6 no puede ser excluida.

10. REFERENCIAS

Abbracchio MP, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Miras-Portugal MT, King BF, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA, Burnstock G. 2003. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol. Sci.* 24: 52–55.

Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA. 2006. International Union of Pharmacology LVIII. Update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanism and pathophysiology to therapy. *Pharmacol. Rev.* 58: 281-341.

Abood LG, Koketsu K, Miyamoto S. 1962. Outflux of various phosphates during membrane depolarisation of excitable tissues. *Am. J. Physiol.* 202: 469–474.

Aguado LI, Petrovic SL, Ojeda SR. 1982. Ovarian beta-adrenergic receptors during the onset of puberty: characterization, distribution, and coupling to steroidogenic responses. *Endocrinology*; 110: 1124-1132.

Alvaggi C, Clarizia R, Mollo A, Ranieri A, De Placido G. 2006. Outlook: who needs LH in ovarian stimulation? *Reprod. Biomed. Online* 12: 599-607.

Arellano RO, Woodward RM, Miledi R. 1996. Ion channels and membrane receptors in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *Ion Channels* 4: 203-259.

Arellano RO, Garay E, Miledi R. 1998. Cl⁻ currents activated via purinergic receptors in *Xenopus* follicles. *Am. J. Physiol.* 274: 333-40.

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.

Arellano RO, Garay E, Vázquez-Cuevas F. 2009. Functional interaction between native G protein-coupled purinergic receptors in *Xenopus* follicles. *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* 106: 16680-16685.

Armstrong DG, Webb R. 1997. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Rev. Reprod.* 2: 139-146.

Balsinde J, Winstead MV, Dennis EA. 2002. Phospholipase A₂ regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett.* 531: 2–6.

Barnard EA, Burnstock G, Webb TE. 1994. G protein-coupled receptors for ATP and other nucleotides: a new receptor family. *Trends Pharmacol. Sci.* 15: 67–70.

Berti-Mattera LN, Wilkins PL, Madhun Z, Suchovsky D. 1996. P2-purinergic receptors regulate phospholipase C and adenylate cyclase activities in immortalized Schwann cells. *Biochem. J.* 314: 555–561.

Bianco F, Fumagalli M, Pravettoni E, D'Ambrosi N, Volonte C, Matteoli M, Abbracchio MP, Verderio C. 2005. Pathophysiological roles of extracellular nucleotides in glial cells: differential expression of purinergic receptors in resting and activated microglia. *Brain Res Rev* 48:144–156.

Bjersing L. 1978. Maturation, morphology and endocrine function of the follicular wall in mammals. In: The mammalian ovary: comparative biology. *Raven Press*. New York. 181-214.

Boarder M, Webb TE. 2001. P2Y receptors structure and function. In: Purinergic and pyrimidinergic signalling: handbook of experimental pharmacology. *Abbracchio MP and Williams M eds*). Heidelberg. Vol. 151 part I: 65–88.

Bodin P, Burnstock G. 2001. Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem. Res.* 26: 959-969.

Bowler WB, Birch MA, Gallagher JA, Bilbe G. 1995. Identification and cloning of human P2U purinoceptor present in osteoclastoma, bone, and osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* 10: 1137–1145.

Bogdanov YD, Wildman SS, Clements MP, King BF, Burnstock G. 1998. Molecular cloning and characterization of rat P2Y4 nucleotide receptor. *Br. J. Pharmacol.* 124: 428–430.

Brinson AE, Harden TK. 2001. Differential regulation of the uridine nucleotide activated P2Y4 and P2Y6 receptors: SER-333 and SER-334 in the carboxyl terminus are involved in agonist-dependent phosphorylation desensitization and internalization of the P2Y4 receptor. *J. Biol. Chem.* 276: 11939–11948.

Burnstock G. 1999. Purinergic cotransmission. *Brain Res. Bull.* 50: 355-357.

Burnstock G. 2007. Purine and pyrimidine receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* 64: 1471-1483.

Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A. 1970. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by nonadrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br. J. Pharmacol.* 40: 668–688.

Burnstock G, Fredholm BB, North RA, Verkhratsky A. 2010. The birth and postnatal development of purinergic signaling. *Acta Physiol (Oxf)* 199: 93-147.

Chang K, Hanaoka K, Kumada M, Takuwa Y. 1995. Molecular cloning and functional analysis of a novel P2 nucleotide receptor. *J. Biol. Chem.* 270: 26152–26158.

Chappell SC, Howles C. 1991. Reevaluation of the roles of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the ovulatory process. *Hum. Reprod.*, 6: 1206-1212.

Charlton ME, Williams AS, Fogliano M, Sweetnam PM, Duman RS. 1997. The isolation and characterization of a novel G protein-coupled receptor regulated by immunologic challenge. *Brain Res.* 764: 141–148.

Chávez-Genaro R, Lombide P, Domínguez R, Rosas P, Vázquez-Cuevas F. 2007. Sympathetic pharmacological denervation in ageing rats: effects on ovulatory response and follicular population. *Reprod. Fertil. Dev.* 19: 954-960.

Cheung KK, Ryten M, Burnstock G. 2003. Abundant and dynamic expression of G protein-coupled P2Y receptors in mammalian development. *Dev. Dyn.* 228: 254–266.

Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.

Communi D, Piroton S, Parmentier M, Boeynaems JM. 1995. Cloning and functional expression of a human uridine nucleotide receptor. *J. Biol. Chem.* 270: 30849–30852.

Communi D, Parmentier M, Boeynaems JM. 1996. Cloning, functional expression and tissue distribution of the human P2Y6 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222: 303–308.

Communi D, Govaerts C, Parmentier M, Boeynaems JM. 1997. Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 272: 31969–31973.

Communi D, Paindavoine P, Place GA, Parmentier M, Boeynaems JM. 1999. Expression of P2Y receptors in cell lines derived from the human lung. *Br. J. Pharmacol.* 127: 562-568.

Cotecchia S, Scheer A, Diviani D, Fanelli F, De Benedetti PG. 1998. Molecular mechanisms involved in the activation and regulation of the α_1 -adrenergic receptor subtypes. *Farmacologia* 53: 273-277.

Curry Jr TE, Lawrence Jr IE, Burden HW. 1984. Effect of ovarian sympathectomy on follicular development during compensatory ovarian hypertrophy in the guinea-pig. *J. Reprod. Fert.* 71: 39-44.

Dyer CA, Erickson GF. 1985. Norepinephrine amplifies human chorionic gonadotropin-stimulated androgen biosynthesis by ovarian theca-interstitial cells. *Endocrinology* 116: 1645-1652.

Erb L, Garrad R, Wang Y, Quinn T, Turner JT, Weisman GA. 1995. Site-directed mutagenesis of P2U purinoceptors: positively charged amino acids in transmembrane helices 6 and 7 affect agonist potency and specificity. *J. Biol. Chem.* 270: 4185-4188.

Erickson GF, Magoffin DA, Dyer CA, Hofeditz C. 1985. The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocr. Rev.* 6: 371-376.

Farkash Y, Timberg R, Orly J. 1986. Preparation of antiserum to rat cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage and its use for ultrastructural localization of the immunoreactive enzyme by protein A-gold technique. *Endocrinology* 118: 1353-1365.

Fujita Y, Mori T, Suzuki A, Nihnobu K, Nishimura T. 1981. Functional and structural relationships in steroidogenesis *in vitro* by human corpora lutea during development and regression. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 53: 744-751.

Fumagalli M, Brambilla R, D'Ambrosi N, Volonte C, Matteoli M, Verderio C, Abbracchio MP. 2003. Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: role of P2X and P2Y receptors. *Glia* 43: 218-230.

Garay E, Arellano RO. 2001. Transmission of purinergic-evoked electrical signals from cumulus cells to the oocyte in the mouse. *Biol. Reprod.* 64: 152-153.

Gendron FP, Newbold NL, Vivas-Mejia PE, Wang M, Neary JT, Sun GY, Gonzalez FA, Weisman GA. 2003. Signal transduction pathways for P2Y2 and P2X7 nucleotide receptors that mediate neuroinflammatory responses in astrocytes and microglial cells. *Biomed. Res.* 14: 47–61.

Guyton A, Hall J. 1997. Tratado de fisiología médica. *Mc Graw Hill Interamericana*. México, DF. 1110-1111.

Gwynne JT, Strauss III JF. 1982. The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroid glands. *Endocr. Rev.* 3: 299-329.

Hillier SG. 1994. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Hum. Reprod.* 44: 561-568.

Ho C, Hicks J, Salter MW. 1995. A novel P2-purinoceptor expressed by a subpopulation of astrocytes from the dorsal spinal cord of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 116: 2909–2918.

Holton FA, Holton P. 1954. The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots: A possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings. *J. Physiol. (Lond.)* 126: 124–140.

Hutchings H, Ortega N, Plouet J. 2003. Extracellular matrix-bound vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell adhesion, migration, and survival through integrin ligation. *FASEB J.* 17: 1520–1522.

Jacobson KA, Jarvis MF, Williams M. 2002. Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets. *J. Med. Chem.* 45: 4057–4093.

Jiang Q, Guo D, Lee BX, van Rhee AM, Kim YC, Nicholas RA, Schachter JB, Harden TK, Jacobson KA. 1997. A mutational analysis of residues essential for ligand recognition at the human P2Y1 receptor. *Mol. Pharmacol.* 52: 499 – 507.

Juárez-Espinosa, AB. 2006. Expresión de los receptores purinérgicos durante la foliculogénesis en mamíferos. Tesis de Maestría, Instituto de Neurobiología, UNAM.

Kamada S, Blackmore PF, Oehninger S, Gordon K, Hogden GD .1994. Existence of P2-purinoreceptors on human and porcine granulosa cells. *J. Clin. Endocrin. Metab.* 78: 650-656.

Kim KC, Park HR, Shin CY, Akiyama T, Ko KH. 1996. Nucleotide-induced mucin release from primary hamster tracheal surface epithelial cells involves the P2U purinoceptor. *Eur. Respir. J.* 9: 1579.

Kirischuk S, Scherer J, Kettenmann H, Verkhratsky A. 1995. Activation of P2-purinoreceptors triggered Ca^{2+} release from IP_3 -sensitive internal stores in mammalian oligodendrocytes. *J. Physiol. (Lond.)* 483: 41–57.

Knobil E, Neill J. 1994. The Physiology of Reproduction. *Raven Press*. New York. Vol. I: 573-577, vol. II: 626-628.

Köttgen M, Löffler T, Jacobi C, Nitschke R, Pavenstädt H, Schreiber R, Frische S, Nielsen S, Leipziger J. 2003. P2Y6 receptor mediates colonic NaCl secretion via differential activation of cAMP-mediated transport. *J. Clin. Investig.* 111: 371–379.

Kumari R, Goh G, Ng LL, Boarder MR. 2003. ATP and UTP responses of cultured rat aortic smooth muscle cells revisited: dominance of P2Y2 receptors. *Br. J. Pharmacol.* 140: 1169–1176.

Kunapuli SP, Daniel JL. 1998. P2 receptor subtypes in the cardiovascular system. *Biochem. J.* 336: 513–523.

Lambrecht G, Braun K, Damer M, Ganso M, Hildebrandt C, Ullmann H, Kassack MU, Nickel P. 2002. Structure-activity relationships of suramin and pyridoxal- 5-phosphate derivatives as P2 receptor antagonists. *Curr. Pharm. Des.* 8: 2371–2399.

Lazarowski ER, Watt WC, Stutts MJ, Boucher RC, Harden TK. 1995. Pharmacological selectivity of the cloned human P2U-purinoceptor: potent activation by diadenosine tetraphosphate. *Br. J. Pharmacol.* 116: 1619–1627.

Lazarowski ER, Rochelle LG, O’Neal WK, Ribeiro CM, Grubb BR, Zhang V, Harden TK, Boucher RC. 2001. Cloning and functional characterization of two murine uridine nucleotide receptors reveal a potential target for correcting ion transport deficiency in cystic fibrosis gallbladder. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297: 43– 49.

Leung P, Adashi E. 2004. The Ovary. *Elsevier Academic Press.* San Diego. 4-7, 513-514.

Li JM, Fan LM, Shah A, Brooks G. 2003. Targeting $\alpha v\beta 3$ and $\alpha_5\beta_1$ for gene delivery to proliferating VSMCs: synergistic effect of TGF- β_1 . *Am. J. Physiol.* 285: H1123–H1131.

Lieberman S, Greenfield NJ, Wolfson A. 1984. A heuristic proposal for understanding steroidogenic process. *Endocr. Rev.* 5: 128-148.

Lustig KD, Landis DM, Hicks-Taylor CS, Zhang X, Erb L, Sportiello M, Weisman GA. 1992. Mechanisms by which extracellular ATP and UTP stimulate the release of prostacyclin from bovine pulmonary artery endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1134: 61–72.

Magoffin DA. 1989. Evidence that luteinizing hormone-stimulated differentiation of purified ovarian thecal-interstitial cells is mediated by both type I and type II adenosine 3'-5'-monophosphate-dependent protein kinases. *Endocrinology* 125: 1464-1473.

Magoffin DA. 2004. The role of the ovary in the genesis of hyperandrogenism in: The ovary. *Elsevier Academic Press*. San Diego. 513-522.

Magoffin DA. 2005. Ovarian theca cell. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 37: 1344-1349.

Magoffin DA, Erickson G. 1988. Purification of ovarian theca-interstitial cells by density gradient centrifugation. *Endocrinology* 122: 2345-2347.

Malam-Souley R, Seye C, Gadeau AP, Loirand G, Pillois X, Campan M, Pacaud P, Desgranges C. 1996 Nucleotide receptor P2U partially mediates ATP-induced cell cycle progression of aortic smooth muscle cells. *J. Cell. Physiol.* 166: 57-65.

Mamedova LK, Joshi BV, Gao ZG, von Kügelgen I, Jacobson KA. 2004. Diisothiocyanate derivatives as potent, insurmountable antagonists of P2Y6 nucleotide receptors. *Biochem. Pharmacol.* 67: 1763-1770.

Marteau F, Le Poul E, Communi D, Labouret C, Savi P, Boeynaems JM, Gonzalez NS. 2003. Pharmacological characterization of the human P2Y13 receptor. *Mol. Pharmacol.* 64: 104-112.

Martin KA, Kertesz SB, Dubyak GR. 1997. Down-regulation of P2U-purinergic nucleotide receptor messenger RNA expression during in vitro differentiation of human myeloid leukocytes by phorbol esters or inflammatory activators. *Mol. Pharmacol.* 51: 97-108.

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, Fritz S. 2002. Ovarian acetylcholine and muscarinic receptors: hints of a novel intrinsic ovarian regulatory system. *Microsc. Res. Tech.* 59: 503-508.

Miyagi Y, Kobayashi S, Ahmed A, Nishimura J, Fukui M, Kanaide H. 1996. P2U purinergic activation leads to the cell cycle progression from the G₁ to the S and M phases but not from the G₀ to G₁ phase in vascular smooth muscle cells in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222: 652-658.

Moore DJ, Chambers JK, Wahlin JP, Tan KB, Moore GB, Jenkins O, Emson PC, Murdock PR. 2001. Expression pattern of human P2Y receptor subtypes: a quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction study. *Biochim. Biophys. Acta* 1521: 107-119.

Morales L, Chávez R, Ayala ME, Domínguez R. 1998. Effects of unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in prepubertal rats on the ovulatory response to gonadotrophin administration. *J. Endocrinol.* 158: 213-9.

Nguyen T, Erb L, Weisman GA, Marchese A, Heng HH, Garrad RC, George SR, Turner JT, O'Dowd BF. 1995. Cloning, expression, and chromosomal localization of the human uridine nucleotide receptor gene. *J. Biol. Chem.* 270: 30845-30848.

Nicholas RA, Watt WC, Lazarowski ER, Li Q, Harden K. 1996. Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor. *Mol. Pharmacol.* 50: 224-229.

Parr CE, Sullivan DM, Paradiso AM, Lazarowski ER, Burch LH, Olsen JC, Erb L, Weisman GA, Boucher RC, Turner JT. 1994. Cloning and expression of a human P2U nucleotide receptor, a target for cystic-fibrosis pharmacotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 3275–3279.

Pelegriin P, Surprenant A. 2006. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X₇ receptor. *The EMBO J.* 25: 5071–5082.

Pendergast W, Yerxa BR, Douglass JG 3rd, Shaver SR, Dougherty RW, Redick CC, Sims IF, Rideout JL. 2001. Synthesis and P2Y receptor activity of a series of uridine dinucleoside 5-polyphosphates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11: 157–160.

Pidgeon GP, Tang K, Cai YL, Piasentin E, Honn KV. 2003. Overexpression of platelet-type 12-lipoxygenase promotes tumor cell survival by enhancing $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ integrin expression. *Cancer Res.* 63: 4258–4267.

Pillois X, Chaulet H, Belloc I, Dupuch F, Desgranges C, Gadeau AP. 2002. Nucleotide receptors involved in UTP-induced rat arterial smooth muscle cell migration. *Circ. Res.* 90: 678–681.

Prevot V, De Seranno S, Estrella C. 2004. Glial-neuronal-endothelial interactions and the neuroendocrine control of GnRH secretion. *Adv. Mol. Cell Biol.* 31: 199-214.

Ralevic V, Burnstock G. 1998. Receptors for Purines and Pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50: 415-475.

Rey-Ares V, Lazarov N, Berg D, Berg U, Kunz L, Mayerhofer A. 2007. Dopamine receptor repertoire of human granulosa cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 5: 40.

Rice WR, Burton FM, Fiedeldej DT. 1995. Cloning and expression of the alveolar type II cell P2U-purinergic receptor. *Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol.* 12: 27–32.

Richards SG, Hedin L, Caston L. 1986. Differentiation of rat ovary thecal cells: evidence for functional luteinization. *Endocrinology* 114: 172-178.

Robaye B, Boeynaems JM, Communi D. 1997. Slow desensitization of the human P2Y6 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 329: 231–236.

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.

Saldaña C, Garay E, Rangel GE, Reyes LM, Arellano RO. 2009. Native ion current coupled to purinergic activation via basal and mechanically induced ATP release in *Xenopus* follicles. *J. Cell. Physiol.* 218: 355-65.

Seye CI, Kong Q, Erb L, Garrad RC, Krugh B, Wang M, Turner JT, Sturek M, Gonzalez FA, Weisman GA. 2002. Functional P2Y2 nucleotide receptors mediate uridine 5-triphosphate-induced intimal hyperplasia in collared rabbit carotid arteries. *Circulation* 106: 2720–2726.

Stam NJ, Klomp J, Van de Heuvel N, Olijve W. 1996. Molecular cloning and characterization of a novel orphan receptor (P2P) expressed in human pancreas that shows high structural homology to the P2U purinoceptor. *FEBS Lett.* 384: 260–264.

Strauss III, JF, Schuler LA, Rosenblum MF, Tanaka T. 1981. Cholesterol metabolism by ovarian tissue. *Adv. Lipid Res.* 18: 99-157.

Su C, Bevan, JA, Burnstock G. 1971. [³H]adenosine triphosphate: Release during stimulation of enteric nerves. *Science* 173: 337–339.

Suarez-Huerta N, Pouillon V, Boeynaems J, Robaye B. 2001. Molecular cloning and characterization of the mouse P2Y₄ nucleotide receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 416: 197–202.

Tai CJ, Cheng KW, Choi KC, Nathwani PS, Leung PC. 2000. Expression and regulation of P2U-purinergetic receptor in human granulosa-luteal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85: 1591-1597.

Tai CJ, Kang SK, Choi KC, Tzeng C, Leung PC. 2001a. Antigonadotropic action of adenosine triphosphate in human granulosa-luteal cells: involvement of protein kinase Ca. *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.

Tajima K, Orisaka M, MorP T, Kotsuji F. 2007. Ovarian theca cells in follicular function. *Reprod. Biomed. Online* 15: 591-609.

Vázquez-Cuevas F, Juárez B, Garay E, Arellano RO. 2006. ATP-induced apoptotic cell death in porcine ovarian theca cells through P2X₇ receptor activation. *Mol. Reprod. Dev.* 73: 745-755.

Vázquez-Cuevas F, Zárate-Díaz EP, Garay E, Arellano RO. 2010. Functional expression and intracellular signaling of UTP-sensitive P2Y receptors in theca-interstitial cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8: 88.

Von Kügelgen I, Wetter A. 2000. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 362: 310-23.

Webb TE, Henderson DJ, Roberts JA, Barnard EA. 1998. Molecular cloning and characterization of the rat P2Y4 receptor. *J. Neurochem.* 71: 1348–1357.

Webb RJ, Bains H, Cruttwell C, Carroll J. 2002. Gap-junctions communication in mouse cumulus-oocyte complexes: implications for the mechanism of meiotic maturation. *Reproduction* 123: 41-52.

Weisman GA, Garrad RC, Erb LJ, Santos-Berrios C, Gonzalez FA. 1999. P2Y receptors in the nervous system: molecular studies of a P2Y2 receptor subtype from NG108–15 neuroblastoma (glioma hybrid cells). *Prog. Brain Res.* 120: 33–43.

Westfall D, Torodov L, Mihaylova-Todorov M. 2002. ATP as a cotransmitter in sympathetic nerves and its inactivation by releasable enzymes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303: 439-444.

Wildman SS, Unwin RJ, King BF. 2003. Extended pharmacological profiles of rat P2Y2 and rat P2Y4 receptors and their sensitivity to extracellular H⁺ and Zn²⁺ ions. *Br. J. Pharmacol.* 140: 1177–1186.

Wrutniak-Zołnowska T. 1980. Changes of the secretory activity of ovarian chromaffin cells during the sex cycle of female white rats. *Endokrinologie* 76: 279-287.

Xu J, Weng YI, Simonyi A, Krugh BW, Liao Z, Weisman GA, Sun GY, Simonyi A. 2002. Role of PKC and MAPK in cytosolic PLA₂ phosphorylation and arachidonic acid release in primary murine astrocytes. *J. Neurochem.* 83: 259–270.

11. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Eje hipotálamo-hipófisis-ovario	2
Figura 2. Esquema del folículo ovárico	4
Figura 3. Comunicación entre las células de la teca y granulosa, la esteroidogénesis y la maquinaria celular involucrada	6
Figura 4. Estructura molecular general propuesta para los receptores P2Y	14
Figura 5. Cultivo de células de la teca en medio DMEM/SFB 10%	28
Figura 6. Gel de agarosa-formaldehído al 1% con RNA de cerebro, corazón, ovario y teca	29
Figura 7. Amplificación por PCR de <i>cyp11a</i> , <i>cyp17a</i> , <i>StAR</i> , <i>fshr</i> y <i>β-actina</i>	30
Figura 8. Distribución de CYP11A en teca observada por microscopía confocal	31
Figura 9. Amplificación por PCR de los transcritos de P2Y2, P2Y4 y P2Y6	32
Figura 10. Secuencia de imágenes de la respuesta de células de la teca estimuladas con UTP	33
Figura 11. Registro del aumento de $[Ca^{2+}]_i$ provocado por ATP	35
Figura 12: Registro del aumento de $[Ca^{2+}]_i$ provocado por UTP	36
Figura 13: Registro del aumento de $[Ca^{2+}]_i$ provocada por UDP	38

Figura 14. Curva de inhibición con suramina..... 39

12. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales agonistas y antagonistas de los receptores P2Y.....16

Tabla 2. Protocolo de PCR y oligonucleótidos para la amplificación de los transcritos de P2Y2, P2Y4 y P2Y6 y sus controles.....26