



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**EXPRESIÓN FUNCIONAL DEL RECEPTOR P2Y2 EN EL EPITELIO  
SUPERFICIAL OVÁRICO**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:  
**M. en C. ANA PATRICIA JUÁREZ MERCADO**

DIRECTOR DE TESIS  
DR. FRANCISCO GABRIEL VÁZQUEZ CUEVAS  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA  
COMITÉ TUTOR  
DRA. SELMA ERÉNDIRA AVENDAÑO VÁZQUEZ  
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA (INMEGEN)  
DR. GONZALO MARTÍNEZ DE LA ESCALERA LORENZO  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MÉXICO, D.F. JUNIO DEL 2023



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.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisiología Celular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas y fue apoyado con recursos financieros de PAPIIT-DGAPA-UNAM, México (No. IN202620 para FGV-C e IN202121 para MD-M). Ana Patricia Juárez Mercado es alumna del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y recibió una beca del CONACYT para estudios doctorales (No. 413895).

## RESUMEN

El epitelio superficial ovárico (OSE) es una monocapa celular que recubre la superficie del ovario; participa en la ruptura del mismo OSE durante la ovulación y en su reparación postovulatoria. Estudios previos por nuestro grupo de trabajo han documentado la expresión de receptores purinérgicos en distintas células ováricas sugiriendo la importancia de la señalización purinérgica en la comunicación paracrina-autocrina en la fisiología del ovario.

En un previo reporte se demostró la presencia funcional del receptor purinérgico P2X7 en el OSE durante el proestro proponiendo su posible participación en la apoptosis de las células de los folículos antrales, requisito para que se lleve a cabo la ovulación. Esta evidencia sugiere la importancia de los receptores purinérgicos en este epitelio.

El presente trabajo evidencia la expresión funcional de un receptor de la subfamilia P2Y, el receptor P2Y2 en el OSE de ratón. Mediante inmunohistofluorescencia, demostramos *in-vitro* e *in-situ*, la expresión durante el estro, en dos momentos específicos: próximo a la ovulación y en la reparación postovulación. Al estimular con UTP o con el agonista no hidrolizable, UTP $\gamma$ S se induce la fosforilación de ERK en las células del OSE *in-situ*, la proliferación celular durante la etapa de reparación postovulatoria y se inducen cambios en el crecimiento de los folículos ováricos. La activación del receptor P2Y2 con ATP o UTP genera la movilización de calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ), y la respuesta se abate con el antagonista selectivo al receptor P2Y2, ARC-118925 en cultivo primario de células de OSE y en rebanadas de ovario.

La expresión funcional del receptor P2Y2 evidencia su posible participación en la reparación y remodelación postovulatoria del OSE.

## SUMMARY

The ovarian surface epithelium (OSE) is a cell monolayer that surrounds the surface of the ovary; it participates in the rupture of the OSE during ovulation and its postovulatory repair. Previous studies by our group have documented the expression of purinergic receptors in different ovarian cells, suggesting the importance of purinergic signaling in paracrine-autocrine communication in ovarian physiology.

Particularly in the OSE, there is evidence of the importance of purinergic receptors in this epithelium. In a previous report, the functional presence of the purinergic receptor P2X7 in the OSE was detected during proestrus, proposing its possible participation in the apoptosis of the cells of the antral follicles, a requirement for ovulation.

The present work evidences the functional expression of a receptor of the P2Y subfamily, the P2Y2 receptor in the mouse OSE. By immunofluorescence, we demonstrated *in-vitro* and *in-situ*, the expression of the P2Y2 receptor in the OSE during estrus, at two moments: close to ovulation and postovulation repair. When stimulated with UTP or the non-hydrolyzable agonist, UTP $\gamma$ S, it induces ERK phosphorylation in OSE cells *in-situ*, cell proliferation during the postovulatory repair stage, and induces changes in ovarian follicle growth. Activation of the P2Y2 receptor with ATP or UTP leads to mobilization of intracellular calcium ( $[Ca^{2+}]_i$ ), and the response is abated by the selective P2Y2 receptor antagonist ARC-118925 in primary OSE cell culture and ovarian slices.

The functional expression of the P2Y2 receptor evidences the possible participation in postovulatory repair and remodeling in the OSE.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, No. Becaria 413895), así como a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (No. Cuenta 509003302) por el apoyo económico otorgado durante la realización de este proyecto.

Al Posgrado de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB-UNAM).

Al Instituto de Neurobiología UNAM, Campus Juriquilla (INB-UNAM), por abrirme las puertas de sus instalaciones para formarme como Doctora en Ciencias.

A mi tutor Francisco Gabriel Vázquez Cuevas por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo; por la tutoría, las observaciones críticas y enseñanza durante la elaboración del proyecto y en mi desarrollo profesional.

Al Comité Tutor formado por la Dra. Selma Eréndira Avendaño Vázquez y el Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo por sus observaciones y atinados comentarios a lo largo de mis evaluaciones durante el doctorado.

A la Dra. Tatiana Fiordeliso Coll y a su equipo de trabajo del Laboratorio de Neuroendocrinología Comparada por permitirme realizar varias estancias en su laboratorio.

A mis compañeros del Laboratorio de Fisiología Celular (Laboratorio B-11), por el apoyo académico y moral que recibí durante la realización del doctorado; al Dr. Mauricio Díaz Muñoz, por compartir sus conocimientos, observaciones y comentarios en el proyecto.

A los miembros del jurado por la revisión y comentarios en el presente trabajo.

A la Dra. Verónica Rodríguez Córdova por su gran solidaridad y a Soledad Mendoza Trejo por su asistencia técnica; a la Unidad de Microscopía, a la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos y a la Dra. Ericka A. de los Ríos Arellano por el apoyo técnico; al Laboratorio Universitario de Bioterio, al al M.V.Z. José Martín García Servín, a la Dra. Alejandra Castilla León y a la Dra. María A. Carbajo Mata; a Jessica González Norris por su ayuda en la edición del artículo en inglés; a la Dra. Nuri Aranda por su gran apoyo en los trámites administrativos durante la pandemia.

## DEDICATORIA

A mi pilar importante: Nany, Lolo y Pato<sup>†</sup>; también, a mis leales “friendos” de TJ, SD y L.A.

<b>ÍNDICE</b> .....	7
<b>RESUMEN</b> .....	3
<b>SUMMARY</b> .....	4
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	5
<b>DEDICATORIA</b> .....	6
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	9
• El ovario y la foliculogénesis .....	9
• El ciclo estral .....	13
• El epitelio superficial ovárico (OSE) .....	15
• El papel fisiológico del OSE .....	18
• El papel patológico del OSE .....	23
• El sistema purinérgico .....	24
• La señalización purinérgica en el ovario .....	29
<b>ANTECEDENTES</b> .....	32
<b>HIPÓTESIS</b> .....	35
<b>OBJETIVOS</b> .....	35
• Objetivo General .....	35
• Objetivos Particulares .....	35
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	36
• Animales y seguimiento del ciclo estral .....	36
• Cultivo primario de células del OSE .....	36
• Reverso transcripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) ....	37
• Inmunofluorescencia .....	38
• Obtención de las rebanadas de ovario .....	39
• Dinámica de calcio intracelular .....	39
• Inyección intrabursal .....	40
• Análisis de la proliferación celular <i>in-situ</i> .....	41

• Población folicular .....	41
• Análisis estadístico .....	42
<b>RESULTADOS</b> .....	43
• La citoqueratina 18 es un marcador específico de las células del OSE .....	43
• El receptor P2Y2 se expresa en cultivos primarios de células del OSE de ratón .....	45
• El receptor P2Y2 se expresa en el OSE de ratón <i>in-situ</i> .....	47
• La estimulación de células del OSE <i>in-vitro</i> e <i>in-situ</i> induce cambios en la concentración intracelular de calcio .....	50
• La estimulación de células del OSE <i>in-situ</i> induce cambios en los niveles de fosforilación de ERK .....	53
• La activación del receptor P2Y2 induce la proliferación celular en el OSE .....	58
• La estimulación del receptor P2Y2 a largo plazo induce cambios en la población folicular .....	60
<b>DISCUSIÓN</b> .....	64
<b>CONCLUSIONES</b> .....	69
<b>REFERENCIAS</b> .....	70
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	87
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	90
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	91
<b>ARTÍCULOS PUBLICADOS</b> .....	92

## INTRODUCCIÓN

### **El ovario y la foliculogénesis**

El *ovario* es el principal órgano del sistema reproductor femenino, en este se llevan a cabo dos procesos fisiológicos principales: 1) la diferenciación de los folículos ováricos (foliculogénesis) y la maduración del ovocito para la fertilización, y 2) la síntesis y secreción de las hormonas esteroides (esteroidogénesis), esenciales para el desarrollo folicular, el mantenimiento del tracto reproductivo y sus funciones (Atwood & Vadakkadath Meethal, 2016; Edson et al., 2009; Strauss & Williams, 2018).

El ovario está conformado de las siguientes estructuras: la *corteza*, la cual contiene a los folículos en distintas etapas de desarrollo, una lámina basal denominada *la túnica albugínea* y una envoltura externa de células epiteliales, llamada *epitelio superficial ovárico*; por otra parte, la *médula*, está constituida de tejido conjuntivo laxo llamado *estroma*, con la entrada de la inervación simpática y abundantes vasos sanguíneos (**Figura 1**).

El *folículo*, la unidad funcional del ovario, está formado por la célula germinal, el *ovocito*, el cual se encuentra protegido por varias capas de células de la granulosa especializadas llamadas *células del cumulus* y un conjunto de células que recubren la superficie interna del folículo denominadas *células de la granulosa mural*. La superficie externa está rodeada por varias capas de células alargadas, de linaje fibroblástico llamadas *células de la teca*. Los folículos que aparecen en la corteza, se encuentran inmersos en el *estroma*, un tejido formado de fibroblastos, precursores de los diferentes tipos celulares foliculares, que funciona como tejido de sostén y como un nicho de células troncales para la formación del folículo. (Erickson & Chang, 2007).

La *foliculogénesis* es el proceso de crecimiento y diferenciación del gameto femenino que culmina en la ovulación (Edson et al., 2009).

En los roedores neonatos, el ovario contiene los ovocitos desnudos conformando un sincicio. A partir de este grupo de folículos, bajo la regulación de diversos factores de acción paracrina-autocrina, como el ligando de Kit, el factor de crecimiento fibroblástico

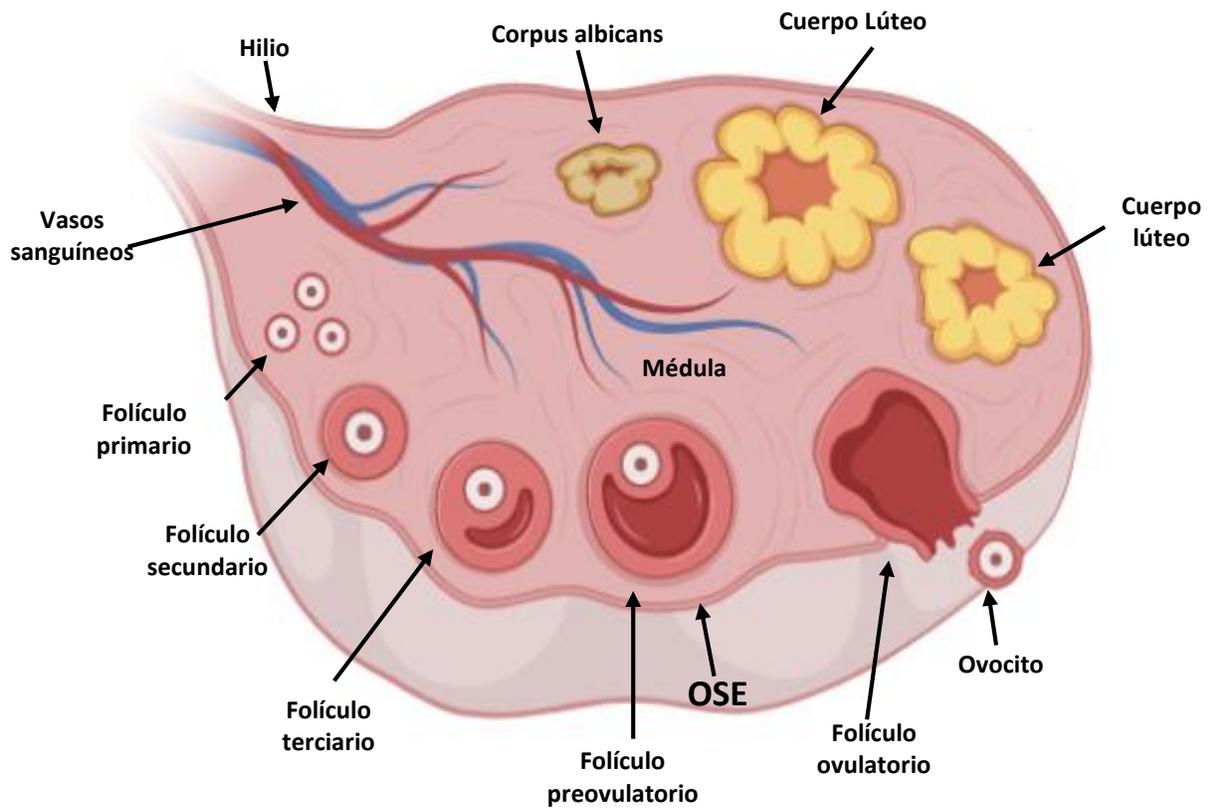
(FGF), la proteína morfogénica ósea 4 (BMP-4), entre otras e independiente de las hormonas gonadotrópicas, se formarán los *folículos primordiales*. Los folículos primordiales se caracterizan por estar rodeados de una capa de células alargadas, de fenotipo fibroblástico, denominadas *pre-granulosa*; esta capa crece y prolifera para convertirse en células cuboidales que ahora se denominan *células de la granulosa* y es en este punto que alcanza el estadio de *folículo primario* (Atwood & Vadakkadath Meethal, 2016; Strauss & Williams, 2018).

Las células de la granulosa continúan proliferando hasta formar, varias capas, es entonces cuando aparece una nueva estructura que rodea todo el folículo, la teca folicular, formada por células con características fibroblásticas, desarrollando así al *folículo secundario*. Durante la progresión folicular, entre las células de la granulosa de los folículos secundarios grandes comienzan a formarse espacios para alcanzar el estadio de *folículo pre-antral*. En esta etapa, comienza la influencia de las hormonas gonadotrópicas, las cuales orquestan el rápido crecimiento de los folículos hasta alcanzar el estadio de *folículo antral*, que se caracteriza por la fusión de los espacios que más adelante forman una cavidad denominada *antro* (Rajkovic et al., 2006; Richards et al., 2010).

Los folículos antrales producen estrógenos en respuesta al estímulo gonadotrópico, hormona que contribuye a sustentar el crecimiento hasta que algunos alcanzan el estado de *folículos preovulatorios* (Li et al., 2021).

Desde el punto de vista endocrino, el control de la esteroidogénesis y la ovulación, se lleva a cabo a través del eje neuroendocrino: Hipotálamo-Hipófisis-Ovario (HHO). La hipófisis, en respuesta a la liberación pulsátil de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) desde el hipotálamo, estimula la síntesis y la liberación de las hormonas gonadotropinas: la Hormona Folículo Estimulante (FSH) y la Hormona Luteinizante (LH). Una vez en la circulación, la FSH estimula a sus receptores localizados en las células de la granulosa y la LH activa a sus receptores en las células de la teca del folículo ovárico, estas señales desencadenan la maduración folicular, la producción de hormonas esteroideas, como el  $17\beta$ -estradiol (E2) y la progesterona (P4) y regulan la ovulación. A su vez, el E2 tiene efecto en el hipotálamo ejerciendo un asa de retroalimentación en el Sistema Nervioso Central (SNC) (Padmanabhan et al., 2018)

La foliculogénesis no es un proceso lineal, en cada oleada se reclutan decenas de folículos que sostienen mutuamente el desarrollo de toda la cohorte y, al mismo tiempo, algunos son eliminados a través del proceso de atresia folicular. Así, sólo algunos folículos antrales llegarán a la ovulación (Irving-Rodgers & Rodgers, 2006). Bajo el comando de un pico en la concentración plasmática de la LH, los folículos ovulatorios expulsan al ovocito hacia las trompas de Falopio, en un proceso que se denomina ovulación (Strauss & Williams, 2018). Posteriormente, las células de los folículos ovulantes experimentan un proceso denominado *luteinización*, que consiste en dar origen al denominado *corpo lúteo*, un complejo celular secretor de progesterona (Richards et al., 2010).



**Figura 1. Estructura del ovario.** El ovario está subdividido en las siguientes regiones: la corteza, rodeado por un epitelio cúbico simple, denominado epitelio superficial ovárico (OSE), los folículos ováricos en distintos estadios y cuerpos lúteos, descansando sobre la túnica albugínea. La médula está compuesta del estroma y recibe los vasos sanguíneos e inervación que se continúa hasta el hilio.

## El Ciclo Estral

La ovulación es un proceso finamente regulado por las hormonas gonadotrópicas y esteroideas. Los cambios cíclicos en la concentración plasmática de estas hormonas determinan el desarrollo espacio temporal de los folículos antrales hasta culminar en la ovulación.

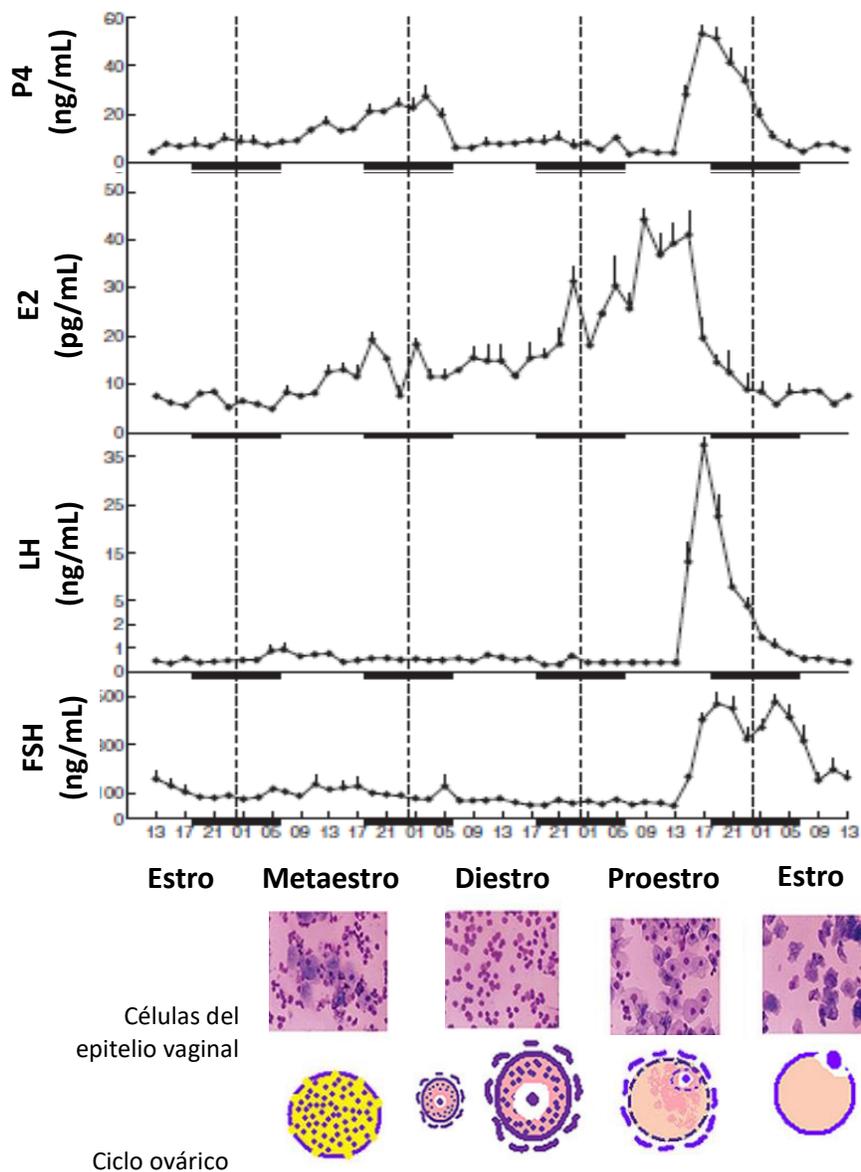
El ciclo estral en roedores tiene una duración aproximada de 4 a 5 días y consta de 4 etapas: *metaestro*, *diestro*, *proestro* y *estro*. En cada una de las etapas se muestran cambios definidos en los niveles séricos de las hormonas sexuales femeninas, como la LH, la FSH, la P4 y el E2 (Butcher et al., 1974; Juárez-Tapia & Miranda-Anaya, 2016). Estas variaciones se exploran y se correlacionan con la citología vaginal, la cual puede observarse por medio de la toma de exudados (Cora et al., 2015; McLean et al., 2012), donde puede apreciarse los diversos tipos celulares del epitelio vaginal característico en cada una de las etapas (**Figura 2**).

La etapa del *proestro* corresponde al crecimiento folicular definido por el incremento preovulatorio de los niveles de E2 que, a su vez, estimula varias regiones del SNC que activan a las neuronas GnRHérgicas del hipotálamo, activando a las neuronas responsivas ubicadas en la pituitaria anterior para liberar la LH y la FSH a la circulación hasta alcanzar los picos máximos. Durante esta etapa, en la citología vaginal se observan células epiteliales ovaladas y nucleadas.

Cuando la FSH alcanza el pico máximo en sus niveles séricos, da inicio la etapa del *estro*. En esta etapa, los niveles de E2 disminuyen, al igual que los picos preovulatorios de gonadotropinas. En un frotis vaginal se observan abundantes células epiteliales escamosas cornificadas, irregulares y sin núcleo. En esta etapa, la ovulación se lleva a cabo en la mañana del *estro* y los procesos de reparación postovulatoria suceden en la tarde del *estro*.

La entrada a la etapa del *metaestro* coincide con el incremento continuo de la P4 y un discreto incremento en el E2, en respuesta a la formación del cuerpo lúteo. El frotis vaginal se caracteriza por la presencia de abundantes leucocitos y pocas células epiteliales cornificadas. Finalmente, en la etapa del *diestro* ocurre una disminución en los niveles de P4 debido a la degeneración del cuerpo lúteo (luteólisis). En una muestra

vaginal se observan leucocitos, pero se detectan pocas células epiteliales cornificadas y comienza a observarse células epiteliales nucleadas iniciando la transición hacia la etapa del proestro.



**Figura 2. Niveles hormonales durante el ciclo estral en roedores.** El diagrama muestra el curso temporal de las concentraciones hormonales de P4, E2, LH y FSH, así como los cambios citológicos presentes en el epitelio vaginal en relación al cambio folicular durante los días (representados en barras blancas y negras en horas) que consta el ciclo estral. Modificado de Butcher et al, 1974; Juárez-Tapia y Miranda-Anaya, 2016.

## El Epitelio Superficial Ovárico (OSE)

El epitelio superficial ovárico (OSE, *ovarian surface epithelium*, por sus siglas en inglés) (**Tabla 1**) es una monocapa celular que cubre la superficie del ovario. Durante el desarrollo, el OSE se forma a partir del epitelio celómico derivado del mesodermo que da origen al celoma intraembrionario y a la gónada. Este origen le confiere características mesénquimales y epiteliales, siendo considerado estrictamente un mesotelio (Auersperg et al., 2001). De esta manera, el OSE expresa marcadores epiteliales como las citoqueratinas 7, 8, 18 y 19 (Auersperg et al., 2001; Gava et al., 2008; van Niekerk et al., 1991), así como el antígeno mucinoso MUC1 (Zhang et al., 1998) y marcadores mesénquimales como la Vimentina y la N-Cadherina (Yi et al., 2015).

El OSE se compone de una capa de células planas a cúbicas, con microvellosidades en el extremo apical que se encuentra separado del estroma ovárico por una lámina basal ubicada sobre una densa capa de tejido conectivo rico en colágena, la túnica albugínea (Wong & Leung, 2007). La integridad del OSE se mantiene gracias a los desmosomas (Ahmed et al., 2007; Siemens & Auersperg, 1988), a las uniones estrechas (Zhu et al., 2004, 2010), a las integrinas (Kruk et al., 1994) y a las cadherinas (Wong et al., 1999).

El OSE expresa receptores sensibles a gonadotropinas, como la FSH, la LH y la GnRH (Wong & Leung, 2007); receptores a hormonas esteroides como el E2, la P4, y ciertos andrógenos (Lau et al., 1999). Además, expresa receptores para el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (McClellan et al., 1999), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) (Daughaday, 1990), factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ) (Jindal et al., 1995) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) (Berchuck et al., 1992). El OSE secreta citocinas como la Interleucina-1 (IL-1) (Ziltener et al., 1993), la Interleucina-6 (IL-6) (Ziltener et al., 1993) y la interleucina -18 (IL-18) (Z. Y. Wang et al., 2002), así como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Kulbe et al., 2007; Wu et al., 1993).

El estudio de este epitelio se ha llevado a cabo en varios vertebrados, como es el caso del cerdo (Ryan et al., 1996), el conejo (Osterholzer et al., 1985), el bovino (Parrott et al., 2000), la oveja (Murdoch et al., 2001), el roedor (McNeil et al., 1998), el primate

(Wright et al., 2010, 2011) y el humano (Edmondson et al., 2002; Okamura et al., 2006). Sin embargo, al extrapolar los resultados se ha observado variabilidad en la expresión de proteínas estructurales y diferencias fisiológicas interespecie (McNeil et al., 1998; Osterholzer et al., 1985; Parrott et al., 2000). Algunas moléculas participan en la comunicación paracrina-autocrina en los distintos procesos fisiológicos del OSE, como es en la regulación hormonal, en la diferenciación celular, en la ovulación, en la proliferación celular y en la migración (Auersperg et al., 2001).

Una de estas moléculas es el EGF, un factor de crecimiento que estimula la proliferación celular del OSE humano y de conejo (J. H. Choi et al., 2005; Rodriguez et al., 1991). Participa en la rápida reparación del epitelio después de la ovulación y en propiciar la transición epitelio-mesénquima (TEM) (Jindal et al., 1995).

Otras moléculas regulan la fisiología del OSE, el TGF $\beta$  inhibe el crecimiento del OSE de humano (Berchuck et al., 1992), y de conejo (Pierro et al., 1996). El HGF estimula el crecimiento del OSE de humano, conejo, rata, ratón y bovino (Wong et al., 2004).

Por otro lado, los datos recabados a partir de cultivos celulares de OSE, así como el estudio *in-vivo*, como *in-situ* del epitelio, muestran diversos resultados, debido a que el OSE es altamente responsivo al entorno (Ahmed et al., 2007).

<b>Características del OSE</b>		
<b>Generales</b>		<b>Referencias</b>
Transición epitelio-mesénquima	Funciona como un mecanismo homeostático	Dyck et al., 1996
Morfología	epitelio cúbico simple	Nicosia et al., 1991
Responsivo a señales del ambiente	Alta	Auersperg et al., 1994
Mecanismos regulatorios autocrinos	En la proliferación celular	Berchuck et al., 1993
<b>Matriz Extracelular</b>		
Membrana basal	Presente	Auersperg et al., 1994
Colágenas estromales	Presente en cultivo	Auersperg et al., 1994
Secreción de proteasas	En la ovulación, en cultivo	Cruet et al., 1999
<b>Adhesión</b>		
Integrinas	$\alpha$ - $\beta$ 1, $\alpha$ 6 $\beta$ 4 y $\alpha$ v $\beta$ 3	Kruk et al., 1994
Cadherinas	N-cadherina	Wong et al., 1999
Otros	Desmosomas	Zhu et al., 2004
<b>Citoesqueleto</b>		
Filamentos intermedio	Queratinas, Vimentina	Auersperg et al., 1994
<b>Moléculas de secreción</b>		
Hormonas	GnRH, Inhibina	Kang et al., 2000; Welt et al., 1997
Factores de crecimiento	TGF $\beta$ , TNF $\alpha$	Wu et al., 1992
Citocinas	IL-1, IL-6, M-CSF, G-CSF, GM-CSF	Marth et al., 1996
Otros	Mucina (MUC1)	Zhang et al., 1998
<b>Receptores a:</b>		
Hormonas	GnRH, Activina, FSH, LH	Kang et al., 2000
Esteroides	Estrógenos, Progesterona, Andrógenos	Lau et al., 1999
Factores de crecimiento	EGF, TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , HGF, PDGF	Neufeld et a., 1994

**Tabla 1. Características generales y moleculares del epitelio superficial ovárico (OSE).** La siguiente tabla muestra, a manera de resumen, la expresión de receptores, factores de crecimiento, moléculas de secreción, proteínas de adhesión y de la matriz extracelular presentes en el OSE. Modificado de Auersperg et al, 2001.

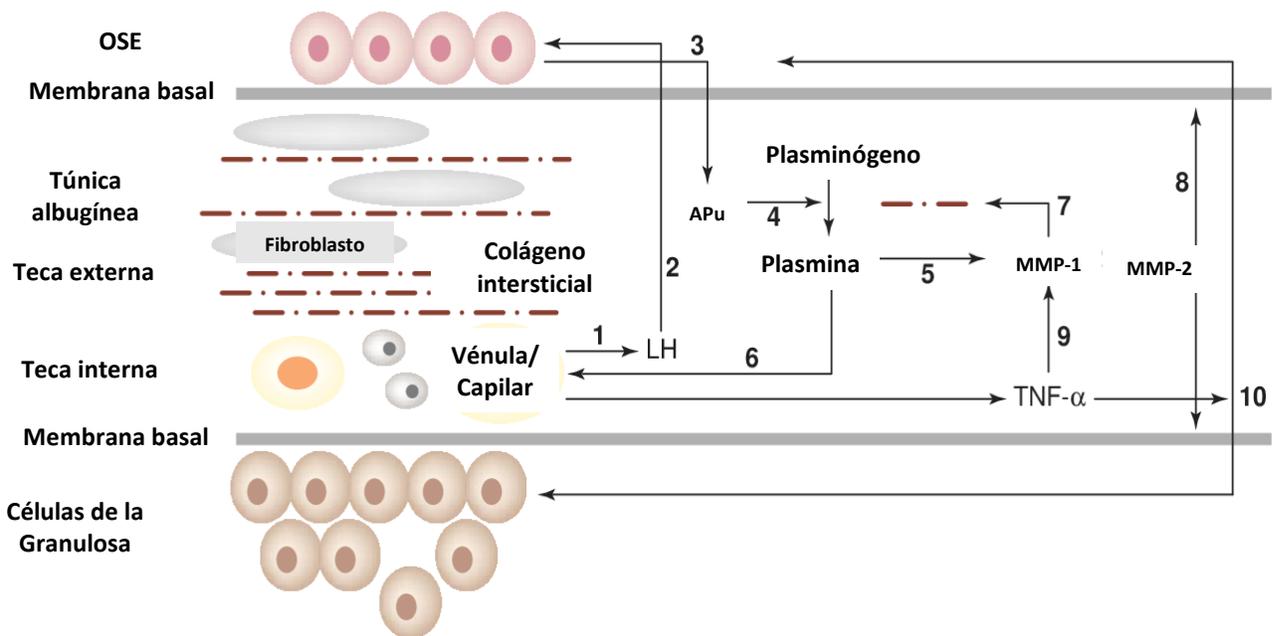
## El Papel Fisiológico del OSE

Se ha propuesto que el OSE es un elemento esencial en la regulación del proceso ovulatorio, en la ruptura del epitelio durante la ovulación (**Figura 3**) (Murdoch & McDonnel, 2002; Russell & Robker, 2007), y en la reparación postovulatoria (Singavarapu et al., 2010). Estos procesos que ocurren en cada ciclo ovulatorio (**Figura 4**), el OSE está involucrado y es fundamental en cada una de ellas, se dividen en 3 etapas: *la fase inicial de la ovulación, la fase de ruptura y la fase de reparación.*

La *fase inicial de la ovulación* (**Figura 4**) sucede en respuesta al pico de la LH, inducida por los estrógenos, la LH actúa sobre sus receptores localizados en las células de la teca, y en las células del OSE. Por efecto de la LH, ocurre la segunda división meiótica del gameto, la expansión de las células del cumulus en el folículo dominante y el aumento en el volumen antral, la síntesis de ácido hialurónico, la expulsión del ovocito y la luteinización de las células de la granulosa. Todos estos cambios en la estructura folicular conducen al aumento en la irrigación sanguínea en el folículo debido al adelgazamiento de las capas de colágena que lo rodean. A su vez, el folículo ovárico sobresale de la superficie ovárica y empuja a las células del OSE formando el punto de ruptura denominado *ápice*. Al romperse el sitio, se presenta la hemorragia, y con ello, la liberación de las prostaglandinas, la histamina, la vasopresina y al activador del plasminógeno urocina (APu), desencadenando la cascada lítica o de ruptura y la formación del canal ovulatorio.

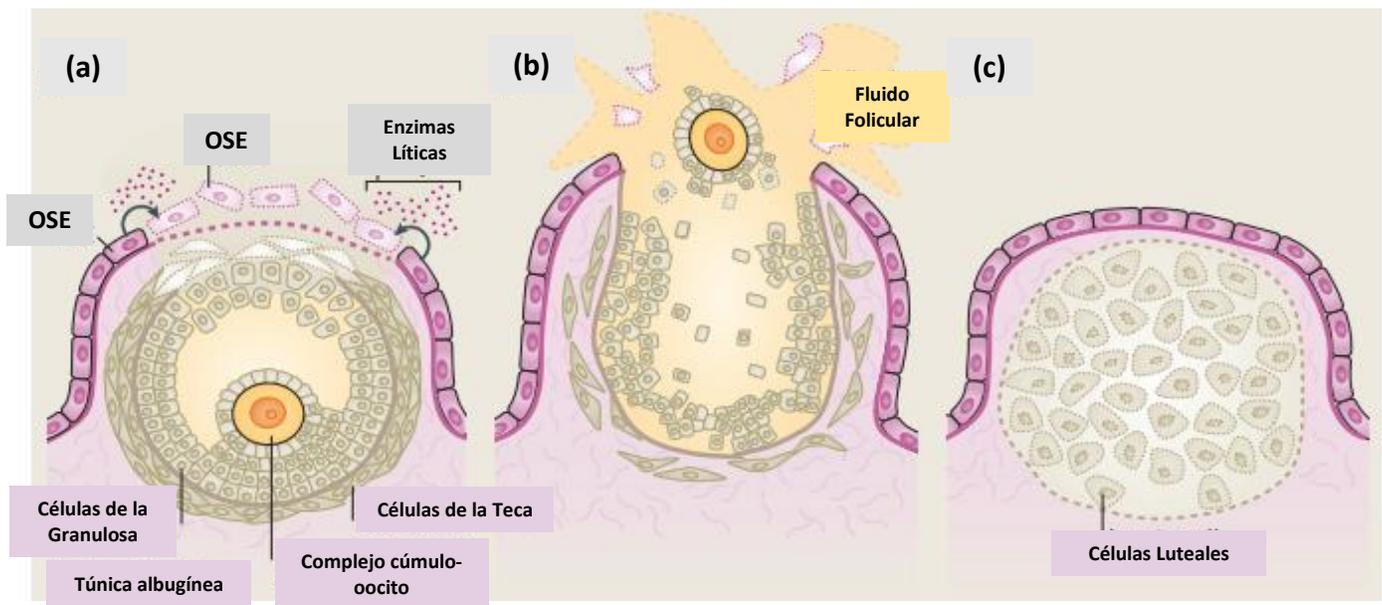
En la *fase de ruptura*, las células del OSE, la lámina basal donde descansa este epitelio, la túnica albugínea, y las distintas células ováricas que conforman al folículo ovárico (células de la granulosa y de la teca, así como sus respectivas láminas basales), presentan proteólisis y degradación. Esta fase ha sido ampliamente estudiada y esquematizada por Murdoch y colaboradores (**Figura 3**) de la siguiente manera: las células del OSE, secretan al activador del APu, una enzima proteolítica que degrada la membrana basal. Esta proteína induce un aumento de plasmina que, a su vez, activa a las colagenasas y promueve la liberación del TNF- $\alpha$ , el cual es secretado por las células endoteliales de los vasos sanguíneos que irrigan a las células de la teca; este factor

potencia la colagenólisis mediante la inducción de metaloproteasas como la MMP-1 en las células de la granulosa, la MMP-2 en las células de la teca y los fibroblastos, y la MMP-1 y MMP-9 en el OSE. La MMP-1 degrada a la teca y a la túnica albugínea, y la MMP-2 degrada las membranas basales, debilitando la pared folicular. La cascada proteolítica lleva a la muerte celular por apoptosis en las células del OSE y en las células que conforman al folículo ovárico (pared apical), favoreciendo la formación del estigma.



**Figura 3. Mecanismo de ruptura del OSE durante la ovulación.** Desde los vasos sanguíneos que irrigan la teca interna (1), llega la LH a activar a sus receptores presentes en la membrana plasmática de las células del OSE (2), estimulando la secreción del plasminógeno urocinasa (APu) (3), el cual convertirá al plasminógeno en plasmina (4), que, a su vez, activará a las metaloproteasas (5) y promueve la liberación del TNF- $\alpha$  de las células endoteliales (6). Con la finalidad de degradar las distintas capas celulares que conforman al folículo ovárico, la MMP-1 degradará la túnica albugínea y a la teca (7), y la MMP-2 degradará las membranas basales (8), y así permitir la liberación del ovocito (8). La cascada proteolítica inducida por la TNF- $\alpha$  (9), promueve la apoptosis de las células del OSE y la formación del estigma(10). Modificado de Murdoch y McDonnell et al, 2002.

Por último, en la *fase de reparación (Figura 4)*, el cierre del punto de ruptura (denominado también *estigma*), se lleva a cabo mediante proliferación celular y migración. Las células del OSE de la periferia del punto de ruptura proliferan para sellar la superficie, mientras que otras, migran hacia el estroma y presentan la transición epitelio-mesénquima (TEM), contribuyendo a la formación de la nueva lámina basal y de la matriz extracelular estromal debido a la síntesis de novo de laminina, colágena tipo I, tipo III y tipo IV (Auersperg et al., 1991; Kruk et al., 1994; Ng & Barker, 2015).



**Figura 4. Fases cíclicas en la ruptura y remodelación del OSE.** La primera fase (imagen a, *fase inicial de la ovulación*), consiste en la formación del ápice por efecto de la LH y la serie de cambios estructurales en el folículo que permitirán la expulsión del ovocito. La segunda fase (imagen b, *fase de ruptura*) involucra la ruptura del epitelio, la proteólisis de las distintas capas celulares que conforman al folículo ovárico, la liberación del ovocito durante la ovulación y la formación del estigma en la zona de ruptura. Finalmente, la tercera fase (imagen c, *fase de reparación*), comprende la reparación postovulatoria del epitelio en el punto de ruptura (estigma), a través de la proliferación y migración celular. Modificado de Ng y Barker et al, 2015.

Las zonas con mayor proliferación celular del OSE se encuentran adyacentes a los folículos grandes (Burdette et al., 2006; Singavarapu et al., 2010) y a los cuerpos lúteos (Burdette et al., 2006), en el punto de ruptura (Ng et al., 2014; Singavarapu et al., 2010), y en el hilio (Flesken-Nikitin et al., 2013).

El proceso de reparación que se lleva a cabo en el OSE es dependiente a la edad. Ratonas jóvenes, de 6 a 12 semanas, muestran mayor actividad proliferativa, en comparación con las ratonas envejecidas de 14 a 17 semanas (Mara et al., 2020).

Los mecanismos que subyacen a la fase de reparación no se han descritos detalladamente. Existe evidencia *in-vitro* e *in-vivo* que aportan información acerca de la dinámica de la reparación postovulatoria del OSE.

Hallazgos recientes indican la participación de un nicho de células troncales en una región específica del propio epitelio en la reparación del OSE; esta propuesta fue el producto del trabajo de tres grupos independientes (Flesken-Nikitin et al., 2013; Ng et al., 2014; Szotek et al., 2008). En estos reportes se describió la participación de células con naturaleza troncal, involucradas en la reparación del punto de ruptura en el OSE (Szotek et al., 2008). El nicho donde se localizan las células troncales está localizado en el hilio, el cual es una estructura que une al ovario con el ligamento suspensorio (Flesken-Nikitin et al., 2013), estas células expresan el marcador Lgr5 (Ng et al., 2014). No obstante, el porcentaje de células troncales del OSE ubicadas en el hilio, que expresan dicho marcador, es de alrededor del 10%. En líneas celulares derivadas de carcinoma ovárico se ha reportado que al suprimir la expresión de Lgr5, disminuye la proliferación celular y facilita la metástasis (Liu et al., 2018), considerándolo como un posible blanco para fármacos quimioterapéuticos.

Recientemente, se ha descrito otra población celular que expresa el receptor de la proteína C (*Procr*, por sus siglas en inglés) y se expande una vez ocurrida la ovulación (alrededor del 20%) (J. Wang et al., 2019), independiente del linaje celular que expresa Lgr5. Sin embargo, al igual que la población celular Lgr5+, las células *Procr* representa el 10% del OSE. De manera interesante, cuando se abate la expresión de la población celular *Procr*<sup>+</sup>, se inhibe el cierre del punto de ruptura del OSE, afectando la integridad y homeostasis del epitelio (J. Wang et al., 2020). Se requieren trabajos adicionales que

complementen al estudio de la participación de poblaciones celulares con naturaleza troncal y su relación en la remodelación del OSE.

En lo que respecta a proteínas y posibles vías de señalización involucradas en el proceso de reparación y en el mantenimiento de la integridad del OSE, las propuestas son variadas.

La ciclooxigenasa 2 (COX2) incrementa la supervivencia de las células del OSE durante la reparación a través del receptor 4 de prostaglandina E2 (PTGER4), activando así la fosforilación de AKT, molécula conocida en regular la proliferación celular y la supervivencia (Carter et al., 2019).

El TGFβ1 promueve la reparación del OSE por la inducción de la TEM a través de la activación de la vía de COX2 (Carter et al., 2019, 2021). Sin embargo, esto se estudió en modelos *in-vitro* y al compararlo a un modelo *in-vivo*, la expresión temporal de COX2 no coincide.

La vía de señalización de Wnt se ha propuesto ampliamente debido a que participa en la proliferación celular y en la TEM, procesos fisiológicos importantes para reparar la ruptura del OSE (Usongo & Farookhi, 2012; Xu et al., 2018). Las proteínas Wnt4 y Wnt5a se expresan en el OSE y son esenciales durante la ovulación, pero es la Wnt5a la proteína clave en regular a la Vimentina y la CD44, y en promover la TEM a través de una vía no canónica Ca<sup>2+</sup>-dependiente (Abedini et al., 2020).

Si bien se ha ampliado la información de las posibles moléculas de señalización involucradas en la fase de reparación, el mecanismo completo continúa sin dilucidarse.

Una de las vías de señalización propuestas es a través de las purinas (Vázquez-Cuevas, et al., 2013), no sólo por la liberación de ATP a través de la inervación simpática (Lara & Belmar, 1991), sino por la expresión de diversos receptores purinérgicos en el ovario (Martínez-Ramírez & Vázquez-Cuevas, 2015), tema que se abordará en párrafos posteriores.

## El Papel Patológico del OSE

Aproximadamente, el 90% de los cánceres ováricos son de origen epitelial, de éstos un porcentaje deriva del OSE (Auersperg, 2011). La hipótesis que sugiere la relación entre la carcinogénesis y el OSE es la ruptura del epitelio en cada ovulación a través de la vida reproductiva femenina, debido a que aumenta la probabilidad de generar alteraciones en los mecanismos de reparación postovulatoria del epitelio. En cada ovulación, se generan quistes de inclusión como resultado de la reparación del OSE, factores como la propensión genética, la alimentación, el ambiente, entre otros, pueden generar displasias en estos quistes llevando a la formación de algún carcinoma ovárico (Auersperg, 2013). Sin embargo, esta idea continúa siendo controversial.

Desde el punto de vista histopatológico el carcinoma epitelial ovárico se clasifica en 4 tipos: *endometroide*, *mucinoso*, de *células claras* y *seroso*. Dependiendo de su agresividad y velocidad de diseminación, los tumores se subclasifican en 2 subtipos: Los *tumores tipo I* abarcan los serosos de bajo grado, endometroide de bajo grado, células claras y mucinoso; se cree que éstos se originan en el OSE, procedente de un tumor benigno o limítrofe. Por otro lado, los *tumores tipo II*, desarrollan tumores agresivos, este grupo comprende los tumores serosos de alto grado, endometroides de alto grado e indiferenciados. Estos últimos son tumores agresivos, se descubren ya en etapas avanzadas debido a la metástasis, puesto que invaden el peritoneo y los órganos cercanos al ovario, su origen es aún incierto pero se cree que derivan de puntos de transformación en las trompas de Falopio (Karst & Drapkin, 2010; Okamura & Katabuchi, 2004).

Aún con la controversia que existe sobre el tejido de origen del carcinoma ovárico, el estudio del OSE sigue siendo de interés por sus posibles implicaciones patológicas.

## El Sistema Purinérgico

Las primeras acciones de las purinas como mensajeros químicos extracelulares fueron descritas por Drury y Szent-Györgyi en 1929 (Burnstock, 2014a; Drury & Szent-Györgyi, 1929); décadas posteriores, esta idea fue confirmada por las contribuciones de Robert Berne, Bertil Fredholm y Goefrey Burnstock (Burnstock, 2014a).

En 1972, Burnstock propuso la *hipótesis purinérgica*, cuya idea sugiere que el ATP actúa como un mensajero extracelular (Burnstock, 1972). Actualmente, sabemos que el ATP, sus metabolitos y un grupo amplio de elementos como ectonucleotidasas y receptores específicos conforman el sistema purinérgico de comunicación intercelular (Burnstock, 2014c, 2018).

El ATP se produce por diferentes rutas metabólicas como la glucólisis y la fosforilación oxidativa y se libera al espacio extracelular por vesículas, lisis celular, estimulación mecánica, cambios osmóticos, procesos inflamatorios e hipoxia (Bodin & Burnstock, 2001), a través de diversas proteínas membranales como transportadores específicos (para adenosina, SLC29A1, SLC29A2; concentrador de nucleósido, SLC28A1 Y SLC28A2), canales con dominio de unión a ATP (canales ABC), hemicanales de conexina y panexina, canales maxi-anión y canales aniónicos activados por volumen (A. R. Campos-Contreras et al., 2020; Corriden & Insel, 2010) (**Figura 5**).

Una vez en el espacio extracelular, el ATP es sujeto de hidrólisis por ectonucleotidasas pertenecientes a 4 familias principales: (1) ENTPD/CD39 (ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa) que convierte al ATP y al ADP en ADP y AMP, respectivamente, liberando Pi (2) ENPP (ectonucleótido pirofosfatasa) que convierte al ATP a AMP y libera P<sub>Pi</sub>; (3) Fosfatasas alcalinas (ALP) y (4) NT5E/CD73 (ecto-5'-nucleotidasa) que convierte AMP en adenosina y libera Pi (Al-Rashida & Iqbal, 2014), y la adenosina deaminasa (ADA), convierte la adenosina en inosina. (Camici et al., 2018) (**Figura 5**).

El ATP y sus metabolitos (AMP y adenosina) ejercen sus acciones sobre receptores específicos denominados *receptores purinérgicos*.

Los receptores purinérgicos se clasifican en dos grandes familias: aquellos receptores activados por adenosina se denominan P1 y los receptores activados por ATP y otros nucleótidos, P2. Los receptores P2 se subdividen en dos subfamilias: P2X, que son canales catiónicos activados por ligando y P2Y que son receptores acoplados a proteínas G (**Figura 5**).

Los receptores P2Y pertenecen a la clase A, de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G con 7 dominios transmembranales (TM) hidrofóbicos (Díaz-Muñoz et al., 2019; Jacobson et al., 2020), conectados por 3 asas intracelulares y 3 asas extracelulares. Consta de un N-terminal extracelular y un C-terminal intracelular. Las regiones TM3, TM6 y TM7 están muy conservadas y se han asociado al sitio de unión a ligando (Hillmann et al., 2009; Jacobson et al., 2015).

En la actualidad, se han descrito 8 miembros de la familia de receptores P2Y: P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 y P2Y14. Los receptores P2Y se agrupan con respecto al tipo de proteína G y/o a la sensibilidad a nucleótidos. Un grupo conformado por los receptores P2Y12, P2Y13 y P2Y14 acoplan a proteínas G heterotriméricas cuya subunidad alfa es del tipo Gi (Gai), mientras que otro grupo comprende a los receptores de P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 y P2Y11 que se asocian a proteínas Gαq. El receptor P2Y11 acopla también a la proteína Gαs.

En cuanto a la sensibilidad a nucleótidos (**Tabla 2**) (Zemskov et al., 2011), los receptores P2Y1, P2Y12 y P2Y13 son sensibles principalmente a nucleótidos de adenina; los receptores P2Y2, P2Y4 y P2Y6 son sensibles a nucleótidos de uridina, mientras que P2Y2 y P2Y14 son sensibles a ambos (Costanzi et al., 2004).

El papel de los nucleótidos de uridina como moléculas de señalización extracelular se describió a inicios del año 2000 (Lazarowski & Boucher, 2001). El UTP es un ligando fisiológico de los receptores P2Y2 y P2Y4, y el UDP de los receptores P2Y6 (von Kügelgen, 2006). El mecanismo de liberación UTP ó UDP, es similar a los que promueven la liberación de ATP, por ejemplo, a través de estimulación mecánica, por transportadores y hemicanales (Anderson & Parkinson, 1997). Al igual que con el ATP las ectonucleotidasas de la familia ENTPD y ENPP participan en la hidrólisis de los nucleótidos de uridina (De Ita et al., 2016; Harden & Lazarowski, 1999; Jin et al., 2014).

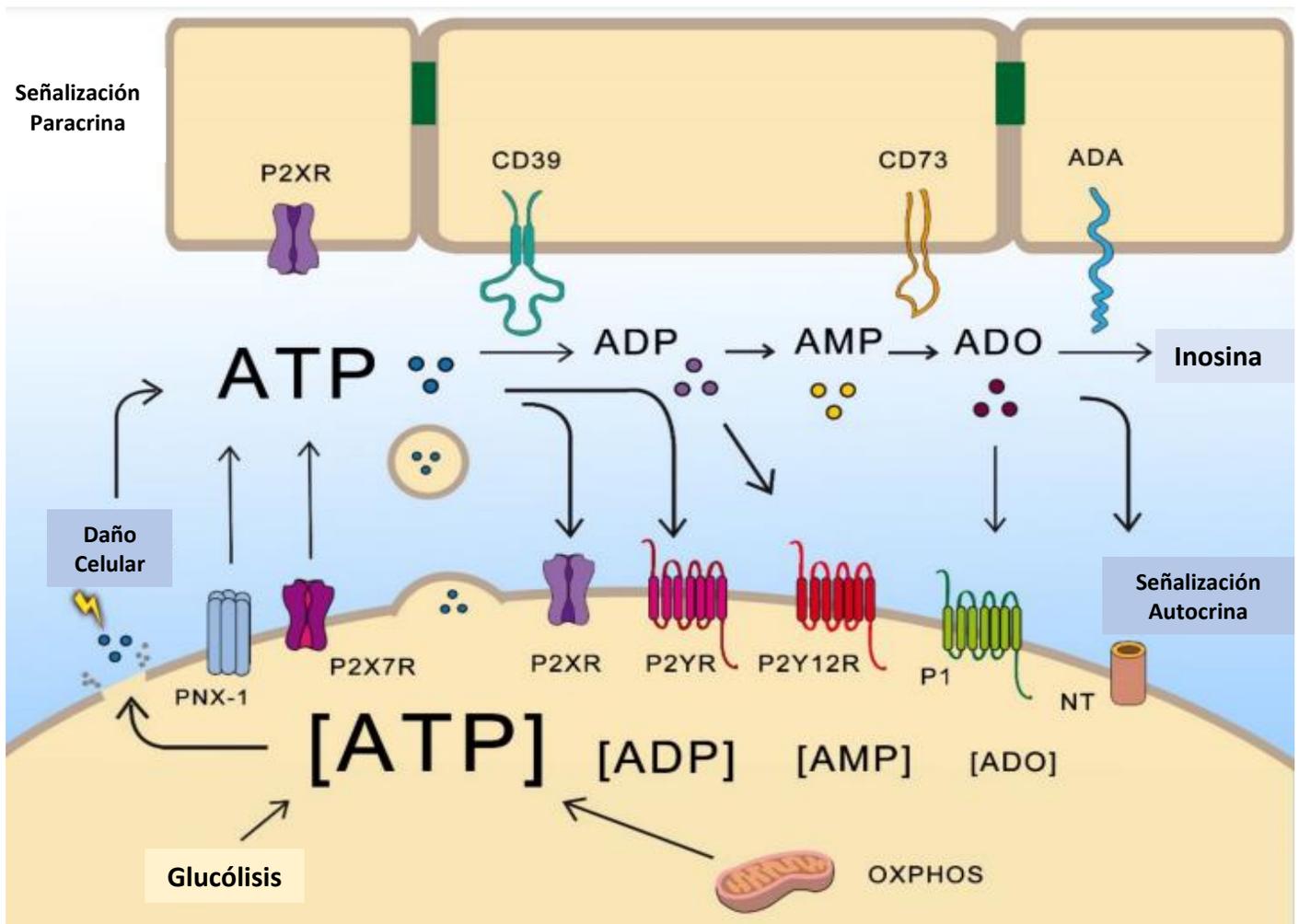
El receptor P2Y2 (originalmente llamado P2U por su sensibilidad a nucleótidos de uridina) se clonó en células de neuroblastoma de ratón (Lustig et al., 1993), y posteriormente en humano (Parr et al., 1994), rata, perro y cerdo (King et al., 1998).

El receptor P2Y2 tiene una distribución ubicua: Se ha detectado en el músculo esquelético, el músculo liso, la vesícula biliar, el corazón, el cerebro, la médula ósea, el pulmón, el estómago, el páncreas, el hígado y, recientemente, en el ovario (Rafehi & Müller, 2018); así mismo ha sido identificado en diversos tipos celulares, por ejemplo, en macrófagos, linfocitos, células epiteliales y células endoteliales (Brunschweiler & Müller, 2006).

Su función se ha relacionado con la inducción de la migración y proliferación celular, en la regulación de respuestas inflamatorias, en la modulación de la quimiotaxis y en procesos de reparación en epitelios (Klepeis et al., 2004).

P2Y RECEPTOR	AGONISTA	EC50	ANTAGONISTA	IC50
P2Y1	MRS 2365	0.4 nM	MRS 2500	0.95 nM
	2-MeSADP	1.2 nM	MRS 2279	51.6 nM
	ADP	8 μM	MRS 2179	330 nM
P2Y2	UTP	1.5-5.8 μM	ARC 118925	1 μM
	ATP	2 μM		
	2-TioUTP	0.035 μM		
	MRS 2768	1.89 μM		
	MRS 4062	640 nM		
P2Y4	UTP	5.9 μM	PSB 16133	233 nM
	2-TioUTP	0.35 μM		
	MRS 4062	23 nM		
P2Y6	UTP	350 nM	MRS 2578	37 nM
	UDP	0.3 μM		
	2-TioUTP	1.5 μM		
	MRS 2693	0.015 μM		
P2Y11	NF 546	5.49 μM	NF 157	463 nM
P2Y12	2-MeSADP	2 nM	ARC 69931	0.4 nM
	ATP	1.9 μM	2-MeSAMP	2.5 μM
	ADP	0.07 μM	ARC 67085	30 μM
	2-MeSATP	0.4 nM		
P2Y13	2-MeSADP	19 nM	MRS 2211	>10 μM
	ADP	0.06 μM		
	ATP	0.26 μM		
P2Y14	UDP-glucosa MRS 2690	0.1-0.5 μM 49 nM	PPTN	1 nM

**Tabla 2. Receptores P2Y y su sensibilidad a agonistas y antagonistas.** Descripción detallada de los distintos agonistas y antagonistas, nativos y sintéticos ampliamente utilizados en receptores de la familia P2Y. Modificado de Zemskov et al, 2011.



**Figura 5. El sistema purinérgico en la comunicación paracrino-autocrino.** La imagen muestra en resumen la señalización purinérgica. El ATP se produce en el interior de la célula en la glucólisis o la fosforilación oxidativa y su liberación al espacio extracelular se lleva a cabo de distintas maneras: a través de hemicanales como las conexinas o panexinas, por canales activados por voltaje o por estimulación mecánica, por difusión facilitada con los transportadores ABC, por vesículas exocíticas o por lisis celular. Una vez en el espacio extracelular, las ectonucleotidasas presentes en la superficie celular, hidrolizan el ATP y otros nucleótidos en sus metabolitos defosforilados que activan a receptores purinérgicos expresados en la membrana plasmática de las mismas células que liberan el ATP o en las células vecinas. Los receptores purinérgicos se clasifican en dos grandes familias: los receptores P1, activados por adenosina y los receptores P2, activados por ATP y otros nucleótidos. También, los receptores P2 se subdividen en dos subfamilias: los P2XR, que son canales catiónicos activados por ligando y los P2YR que son receptores acoplados a proteínas G. Tanto el ATP, como sus nucleótidos, también participan como mensajeros autocrinos o paracrinos. Modificado de Contreras-Campos et al, 2020.

## La señalización purinérgica en el ovario

La expresión de receptores purinérgicos se ha detectado a distintos niveles del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Bjelobaba et al., 2015; Burnstock, 2014b). La región media lateral del hipotálamo, justo en la zona donde se encuentran las neuronas GnRHérgicas, muestra poblaciones equivalentes de receptores purinérgicos P2X, P2Y y de adenosina (Bjelobaba et al., 2015). En la región anterior de la hipófisis, donde se encuentran los gonadotropos, la población purinérgica que predomina, pertenece a la subfamilia P2X (Bjelobaba et al., 2015). Sin embargo, no se ha caracterizado con detalle el papel de estos receptores en dichas regiones.

Las distintas funciones ováricas se regulan por el sistema neuroendocrino y por una serie de mensajeros locales (Atwood & Vadakkadath Meethal, 2016). Recientemente, se ha estudiado al ATP como mensajero intraovárico; su liberación local resultado de un efecto mecánico o por apoptosis (Schwiebert & Zsembery, 2003), así como la expresión de receptores purinérgicos en las distintas células ováricas sugiere que participa en la fina regulación de la función ovárica.

Una fuente extrínseca de ATP es la inervación simpática (Aguado & Ojeda, 1984; Chávez-Genaro et al., 2007; Spicer, 1986). Los trabajos de Lara y colaboradores establecieron que, en el ovario de la gata, las terminales simpáticas coliberan noradrenalina y ATP en cantidades equimolares, y la denervación, lleva a la reducción de la concentración de ATP en el ovario, alteraciones en el ciclo estral y en la foliculogénesis (Lara & Belmar, 1991).

Otra fuente de nucleótidos es el fluido folicular, en donde se han identificado metabolitos derivados de nucleótidos, como el guanósín monofosfato cíclico (GMPc) o la adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Así mismo, se ha estableciendo un papel en la maduración del ovocito (Eppig et al., 1985). Esto nos sugiere la presencia de la maquinaria metabólica purinérgica en el folículo.

Numerosos trabajos evidencian que la señalización purinérgica es un importante sistema de comunicación paracrina-autocrina que modula procesos celulares como la proliferación celular, la inducción de la apoptosis y en la esteroidogénesis en las distintas células ováricas (Martínez-Ramírez & Vázquez-Cuevas, 2015) (**Figura 6**).

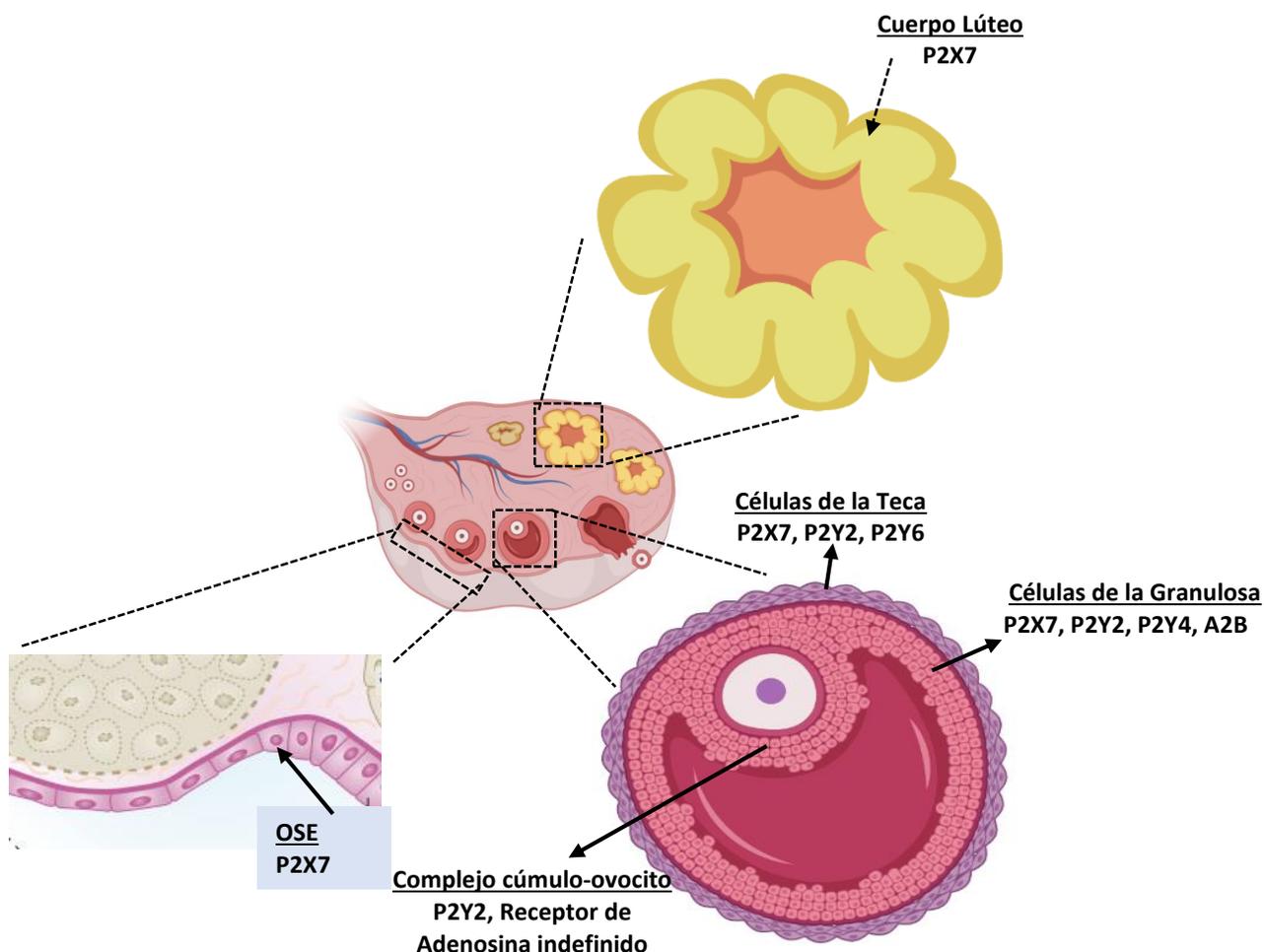
En las células de la teca se ha demostrado que se expresa el receptor P2X7 y su activación farmacológica puede inducir apoptosis (Vázquez-Cuevas et al., 2006). En este mismo tipo celular, se han identificado los receptores purinérgicos P2Y2 y P2Y6, al activarlos con UTP o UDP, se induce un incremento transitorio en la concentración de calcio intracelular. Además, se ha demostrado que la activación del receptor P2Y2 promueve la proliferación por una vía que involucra la actividad de la proteína cinasa C (PKC) y de las cinasas ERK (Vázquez-Cuevas et al., 2010).

En las células de la granulosa de humano (C. J. Tai, Kang, & Leung, 2001), al activar a un receptor de la familia P2Y con ATP, induce las oscilaciones de calcio intracelular a través de la activación de los receptores a IP<sub>3</sub> en el retículo endoplásmico.

En células de la granulosa-luteales, el receptor P2Y6 regula la esteroidogénesis y la proliferación (Bao et al., 2017). Así mismo, se ha mostrado que receptores A2A sensibles a adenosina, en regulación cruzada con los receptores para la LH, potencian la producción de AMPc (Polan et al., 1983).

En las células luteales de murino se detectó la expresión del receptor P2X7, con base en manipulaciones farmacológicas se demostró que el receptor disminuye la proliferación celular. Tanto el ATP, como el BzATP, inhiben la expresión de la ciclina D2 y la ciclina E2, proteínas reguladoras del ciclo celular (J. Wang et al., 2015).

En las células del complejo cúmulo-ovocito (COC) también se ha documentado la expresión funcional de receptores purinérgicos. En las células del cúmulo de ratón se expresa el receptor P2Y2 y su estimulación induce corrientes iónicas que se propagan hasta el ovocito (Arellano et al., 2002).



**Figura 6. Expresión de los receptores purinérgicos en las células ováricas.** En los años recientes, se ha descrito la participación de las purinas en procesos celulares importantes en la fisiología ovárica de diversas especies. En el cuerpo lúteo murino, se expresa el receptor P2X7 y participa en la inhibición de la proliferación celular. En las células de la teca porcina, se expresa el receptor P2X7 y promueve la muerte celular de éstas; en el caso de los roedores, se expresan los receptores P2Y2 y P2Y6, involucrados en la proliferación celular vía  $Ca^{++}/ERK$ . Las células de la granulosa de humano, porcino y aviar se expresan los receptores P2Y2, P2Y4 y P2X7; participan en la modulación de la producción de progesterona, en la movilización del  $Ca^{2+}$  intracelular y en la apoptosis, respectivamente. El complejo cúmulo-ovocito porcino y murino, se expresa un receptor sensible a adenosina y el receptor P2Y2; están involucrados en la inhibición de la maduración del ovocito y en la activación de canales iónicos. En el OSE murino, se expresa el receptor P2X7 involucrado en la apoptosis de los folículos ováricos durante la fase del proestro previo a la ovulación. Modificado de Martínez-Ramírez y Vázquez-Cuevas, 2015.

## **ANTECEDENTES**

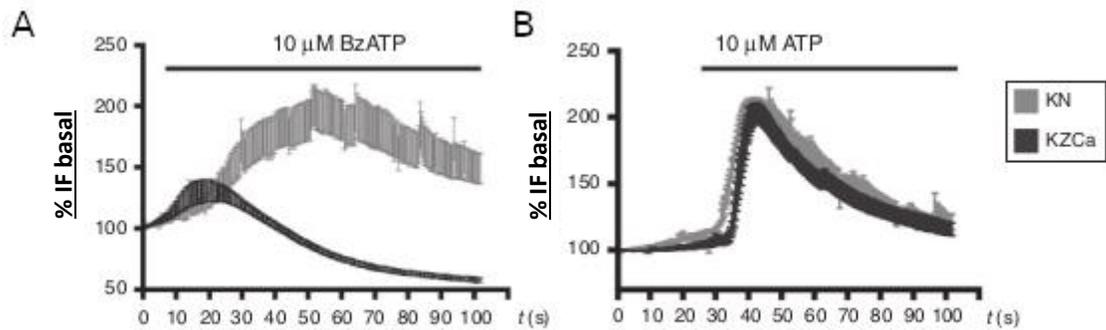
El OSE es una estructura que posee características particulares que, debido a la expresión de marcadores epitelio-mesénquimales, desempeña un papel fundamental en cada una de las fases de la ovulación.

Destacando el particular interés en el proceso de cicatrización del punto de ruptura en el ovario en la fase postovulatoria tiene repercusiones en el contexto patológico, pudiendo ser un centro generador de procesos cancerosos (Auersperg, 2011; Okamura & Katabuchi, 2004).

El interés de nuestro grupo de trabajo es evidenciar el posible papel de la comunicación purinérgica en la reparación postovulatoria de esta estructura. El objetivo de este trabajo es caracterizar la expresión funcional del receptor P2Y2 en el OSE durante la etapa del estro.

En un estudio previo, demostramos que el OSE de ratón expresa al receptor P2X7. Mediante inmunolocalización, observamos que el nivel de expresión del receptor varía a lo largo del ciclo estral, siendo mayor en la etapa del proestro. Una de las respuestas celulares más notable fue que la inyección intrabursal de BzATP, un agonista selectivo de los receptores P2X7, promovía la apoptosis de las células del OSE (Vázquez-Cuevas, et al., 2013).

La caracterización funcional del receptor P2X7 (**Figura 7**), se realizó en cultivos primarios del OSE, analizando cambios en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) inducidos por ligandos purinérgicos. Así, el estímulo con 10  $\mu\text{M}$  de BzATP, indujo un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , que disminuía notablemente en ausencia de calcio extracelular ( $\text{exCa}^{2+}$ ) (**Figura 7A**). Por otra parte, el estímulo con 10  $\mu\text{M}$  de ATP, una concentración lejana a la  $\text{EC}_{50}$  del receptor P2X7 ( $\text{EC}_{50} = 1\text{mM}$ ), generó una respuesta de movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  insensible a la presencia o ausencia de  $\text{exCa}^{2+}$  (**Figura 7B**), sugiriendo que el OSE expresa, además de P2X7 a un receptor P2Y.



**Figura 7. Cambios en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) inducidos por ligandos purinérgicos en cultivos primarios de OSE.** Registros de dinámica de calcio mediante el sensor fluorométrico Fluo-4AM en un cultivo primario de células de OSE. Los efectos generados por el agonista BzATP (A), o por ATP (B) a concentraciones equimolares, en el cambio de la  $[Ca^{2+}]_i$  (representado en porcentaje en intensidad de la fluorescencia basal, %IF). Ambos registros se llevaron a cabo en una Solución Krebs-Ringer Normal (KN, registro en gris), en comparación con aquellos obtenidos en una Solución Libre de  $Ca^{2+}$  (KZCa, registro en negro). Modificado de Vázquez-Cuevas et al, 2013.

En un estudio posterior, también en cultivos primarios de OSE (Lara-Mejía, 2014); caracterizamos la movilización de la  $[Ca^{2+}]_i$ , en respuesta a otros ligandos purinérgicos. El estímulo con UTP, un agonista selectivo de los receptores P2Y2 y P2Y4, indujo respuestas transitorias de incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ . Adicionalmente, ambos receptores se detectaron por inmunofluorescencia. En conjunto, nuestras evidencias sugerían que receptores P2Y2 y/o receptores P2Y4 se expresan en el OSE de ratón.

Debido a que el receptor P2Y2 es prototípico de la familia y a que, en otros tipos celulares, incluidas las células de la teca folicular (Campos-Contreras et al., 2019; Vázquez-Cuevas et al., 2010), es un mediador de la proliferación, decidimos caracterizar su expresión en el OSE y analizar si es capaz de promover la proliferación celular.

Un aspecto fundamental del presente estudio fue que se muestra evidencia *in-situ* de la expresión funcional de P2Y2, dado que el OSE como otros epitelios, al ser aislado de su tejido de origen y puesto en cajas de cultivo, adquiere un fenotipo fibroblástico (Greenburg & Hay, 1982; Okamura et al., 2006), perdiendo sus propiedades epiteliales y no mimetiza las condiciones fisiológicas ováricas, debido a que las células del OSE son altamente responsivas al entorno, como la influencia de los elementos intraováricos

(folículos ováricos y cuerpos lúteos), y la señalización paracrina-autocrina que posee el ovario.

A partir de estas observaciones, es importante el estudio de la participación del receptor P2Y2 en el OSE y su implicación en la proliferación celular durante la reparación postovulatoria y así comprender los mecanismos celulares y moleculares involucrados que aportará información básica sobre una estructura importante en la fisiología del ovario.

## **HIPÓTESIS**

El receptor P2Y2 se expresa en el OSE de ratón, se encuentra acoplado a su vía canónica de transducción de señales (Gq/PLC/Ca<sup>2+</sup>) y su activación farmacológica promueve proliferación celular.

## **OBJETIVO GENERAL**

Demostrar la expresión y función del receptor purinérgico P2Y2 en el OSE y evaluar los efectos de su estimulación farmacológica en la proliferación celular en modelos murinos *in-situ*.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Analizar la expresión del receptor P2Y2 en cultivos primarios de OSE e *in-situ*
2. Documentar la función del receptor P2Y2 mediante el análisis de movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular.
3. Determinar la expresión *in-situ* del receptor P2Y2 en regiones adyacentes al folículo ovárico y al cuerpo lúteo.
4. Analizar la funcionalidad del receptor P2Y2 *in-situ* la movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular y la fosforilación de la cinasa ERK.
5. Evaluar el impacto de la estimulación *in-situ* del receptor P2Y2 sobre la proliferación celular.
6. Analizar el efecto de la estimulación del receptor P2Y2 *in-situ* sobre la población folicular.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Todos los procedimientos empleados en este proyecto fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, protocolo 87.A.

### **Animales y seguimiento del ciclo estral.**

Para este estudio, se emplearon ratonas vírgenes de la cepa C57BL6/J de 8 a 9 semanas de edad, en condiciones de alimentación *ad libitum*, ciclo de 12 h de luz/oscuridad.

El ciclo estral fue monitoreado mediante la toma diaria de frotis vaginales, los cuales fueron teñidos con hematoxilina y eosina. Los animales que presentaron ciclos regulares de 4 días, fueron seleccionados para realizar los experimentos.

### **Cultivo primario de células del OSE.**

Los ovarios de ratonas cíclicas en el día del estro fueron disecados y colocados en medio L-15 (Sigma-Aldrich). Con ayuda de unas pinzas, a los ovarios se les retiró la bursa y el tejido adiposo adyacente, se colocaron en 4 mg/mL de colagenasa en *Solución A* (en mM: 137 NaCl, 5 KCl, 0.5 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.8 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 9.9 HEPES, 4.1 NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 EGTA y 5 Glucosa, a pH= 7.4) y fueron incubados durante 20 min a 37°C. Posteriormente, los ovarios se pasaron 30 veces a través de una punta de micropipeta con el diámetro modificado.

Los ovarios fueron descartados y la solución enzimática fue centrifugada a 2,000 rpm durante 5 min. El precipitado celular fue resuspendido en 20 µL de medio DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Thermo Fisher Scientific). Con el objetivo de evitar la diferenciación del fenotipo epitelial al fibroblástico, se utilizó un gel que asemeja a la matriz extracelular como un medio de sostén en la superficie de la placa de cultivo. Para ello, las células resuspendidas fueron cultivadas durante un tiempo corto (6 h) en placas de vidrio tratadas previamente con colágena de cola de rata.

Transcurrido ese tiempo, las células fueron empleadas para los estudios de dinámica de  $Ca^{2+}$  o fijadas con solución de paraformaldehído al 4% (PFA, Sigma-Aldrich) para las inmunofluorescencias.

### **Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).**

La expresión del transcrito del receptor P2Y2 en las células del OSE se analizó por RT-PCR. Para ello, las células de OSE fueron obtenidas de 10 ratonas cíclicas en el día del estro y se aislaron siguiendo el protocolo mencionado anteriormente.

Después de 6 h de cultivo, el RNA total fue aislado con Trizol (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de las muestras de RNA fueron determinadas por espectrofotometría en un NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) y la integridad de las muestras se analizó por electroforesis, en geles de agarosa.

La reacción de transcripción reversa se realizó con 2  $\mu$ g de RNA tratado previamente con DNAsa, 0.25 mg de Oligo dT, 10 mM de dNTPs y la retrotranscriptasa M-MLV (200 U; Promega). El DNA complementario (cDNA) obtenido fue utilizado para amplificar el transcrito del gen *P2ry2*; *Sod2* se tomó como transcrito constitutivo. La reacción de PCR de punto final se realizó con 2 mM de dNTPs, 10  $\mu$ M de cada oligonucleótido, 5 U de la Taq polimerasa recombinante (Thermo Fisher Scientific) y 2  $\mu$ L de cDNA. Los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR fueron los siguientes: *P2yr2forward* ACCTGGAACCCTGGAATAG; *P2yr2reverse* AGGCGGCATAG GAAGATATAG; *Sod2forward* TGGACAAACCTGAGCCCTAA y *Sod2reverse* GACCCAAAGTCACGCTTGATA. El protocolo de amplificación consistió en: una incubación inicial de 60 s a 95°C; 25 ciclos bajo las siguientes condiciones: 30 s a 95°C, 30 s a 55° y 40 s a 72°C, al terminar se realizó otra incubación a 72°C durante 5 min. Los amplicones fueron teñidos con GelRed (Biotium) y visualizados por electroforesis de agarosa al 1.5%. La identidad fue confirmada por secuenciación y comparación con la secuencia disponible en la plataforma de BLAST.

## **Inmunofluorescencia.**

Para detectar la expresión de distintas proteínas de nuestro interés en el OSE, aquellos ovarios preservados en formalina al 10%, fueron deshidratados en un tren de alcoholes (alcohol 50%-xilol) en un protocolo de 12 h e incluidos en parafina. Posteriormente, con un micrótopo (RM2150, Leica Biosystems), se obtuvieron rebanadas de 10  $\mu\text{m}$  que se recolectaron en laminillas electrocargadas. Los tejidos fueron desparafinizados en una incubadora a 60°C, se rehidrataron en un tren de alcoholes (xilol-alcohol 70%) y fueron sumergidos en una *solución de citratos* 10 mM durante 20 min a 95-100°C. Una vez transcurrido el tiempo, los tejidos fueron incubados otros 20 min a temperatura ambiente, lavados con una *solución de amortiguadora de fosfatos* (PBS) y procesados a realizar las inmunofluorescencias.

La inmunohistofluorescencia realizada en las rebanadas de ovario fue llevado a cabo siguiendo el protocolo previamente reportado (Vázquez-Cuevas, et al., 2013). Brevemente, los tejidos fueron incubados con los anticuerpos primarios anti-P2Y2 (Novus Biologicals LLC), anti-CQ-18 (Thermo Fisher Scientific) o anti-ERK 1/2 fosforilada (Cell Signaling Technology), a una dilución 1:100 a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, fueron incubados con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a Alexa Fluor-488 o anti-IgG de ratón acoplado a Cy5, a una dilución 1:200 durante 2 h a temperatura ambiente. Los núcleos fueron teñidos con 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) o con Yoduro de Propidio (Abcam) y los tejidos fueron montados con *VectaShield* (Vector Laboratories).

Las muestras fueron observadas por microscopía confocal en el equipo Zeiss LSM 780 DUO. Las imágenes fueron capturadas en el programa *ZEN Software* (Carl Zeiss) y analizadas con el programa *ImageJ* (NIH Bethesda), cuantificando la intensidad de la fluorescencia como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF).

Las células del OSE cultivadas en placas de vidrio fueron fijadas con PFA al 4%, lavadas con solución PBS e incubadas con un anticuerpo contra el marcador epitelial citoqueratina 18 (CQ-18, Dilución 1:200; Thermo Fisher Scientific) o contra el receptor P2Y2 (Dilución 1:200; Novus Biologicals LLC). La contratinción de los núcleos se realizó

con Yoduro de Propidio (Abcam) y fueron observadas por microscopía confocal (Carl Zeiss).

### **Obtención de rebanadas vivas de ovario**

Las rebanadas vivas de ovario fueron obtenidas siguiendo un protocolo previamente reportado (Bahena-Alvarez et al., 2019), el cual se evaluó y aprobó y por la comisión de bioética del INB. Las ratonas fueron sacrificadas por dislocación cervical, se disecaron los ovarios, se removió la bursa y el tejido adiposo adyacente y se sumergieron en agarosa de bajo punto de fusión al 3% disuelta en *Solución Krebs Ringer* (KRS) (en mM: 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub> y 10 Glucosa; gasificada con carbógeno y ajustada a pH= 7.4).

Después, el bloque de agarosa se pegó en la platina de un vibratomo (VT1000S Leica Biosystems), y fue sumergido en solución KRS, gasificada con carbógeno a temperatura a punto de congelación. En el vibratomo se obtuvieron rebanadas de 150 µm de espesor las cuales se colocaron en una caja Petri con Solución KRS y se mantuvieron en una atmósfera de 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> a temperatura ambiente.

### **Dinámica de calcio intracelular.**

Los registros de Ca<sup>2+</sup> en rebanadas de ovario se realizaron siguiendo el protocolo previamente reportado (Bahena-Alvarez et al., 2019). Las rebanadas de ovario de ratón fueron incubadas con 5 µM del sensor Fluo 4-AM (Molecular Probes) y 0.1% de ácido plurónico en KRS durante 25 min a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo de incubación con el sensor de Ca<sup>2+</sup>, las rebanadas fueron lavadas y colocadas en una cámara de registro, previamente tratada con poli-L-lisina, en KRS. La solución de la cámara era recirculada por medio de una bomba peristáltica (ISMATEC High Precision Multichannel Pump), la perfusión se realizó por gravedad. La cámara de registro fue colocada bajo un microscopio estereoscópico de fluorescencia (Leica M205FA; Objetivo Plan APO 2.0X; Leica Microsystems), las rebanadas se estimularon con los ligandos: ATP (Cat. No. A2383-10G; Sigma-Aldrich), UTP (Cat. No. U6628-100MG; Sigma-Aldrich) o con el antagonista selectivo al receptor P2Y<sub>2</sub>, ARC-118925 (Cat. No. 4890; Tocris Bioscience) durante 30 s, de acuerdo al protocolo indicado

en cada experimento, y la adquisición de imágenes se llevó a cabo con una cámara digital (Photometrics Cool SNAP HQ2 Monochrome Camera), a una exposición de 200 ms y utilizando el programa *Micro Manager*. Las secuencias de imágenes fueron analizadas con el programa *ImageJ* (NIH-Bethesda), seleccionando cada célula del OSE como regiones de interés (ROI), de cada rebanada. Los valores en la intensidad de la fluorescencia fueron normalizados, siguiendo la siguiente fórmula:  $(F/F_0) * 100$ , donde F representa la intensidad de fluorescencia obtenida a cualquier tiempo y F<sub>0</sub> representa la intensidad de fluorescencia mínima antes de añadir el estímulo. Las variaciones en la intensidad de fluorescencia fueron expresadas en unidades arbitrarias de fluorescencia con respecto del basal (%UAF) en función del tiempo (seg).

Para el registro de las células de OSE cultivadas en placas de vidrio, se cargaron con 5  $\mu$ M de Fluo 4-AM disuelto en KRS y fueron incubadas durante 25 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, las placas de vidrio fueron colocadas en una cámara de registro en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i, Nikon Corp.), con perfusión constante (2 mL/min), por gravedad. Después, las células se dejaron reposar durante 60 s previo al estímulo y se añadieron los agonistas o antagonista previamente mencionados durante 30 s en la solución de perfusión. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa *ImageJ* (NIH-Bethesda), siguiendo el protocolo de análisis de los datos anteriormente mencionado. Las variaciones en la intensidad de fluorescencia fueron expresadas en unidades arbitrarias de fluorescencia con respecto del basal (%UAF) en función del tiempo (seg).

### **Inyección intrabursal.**

Con la finalidad de analizar la funcionalidad del receptor P2Y<sub>2</sub> *in-vivo*, se realizó la inyección intrabursal de ligandos purinérgicos (Cordero et al., 2010; Vázquez-Cuevas, et al., 2013), en ratonas cíclicas, a las 8 h (preovulación) y a las 14 h (postovulación).

Para esto, las ratonas fueron anestesiadas con una mezcla de xilazina (1 mg/Kg) y ketamina (25 mg/Kg), se realizó una incisión en la parte dorsal para exponer el ovario. Con ayuda de un sistema de inyección y bajo el microscopio estereoscópico se aplicaron 10  $\mu$ L del agonista (UTP 100  $\mu$ M) o del antagonista (ARC-118925 10  $\mu$ M) disueltos en

solución PBS 1X, en el espacio entre la bursa y el ovario. El ovario contralateral, recibió vehículo (PBS 1X).

Una vez realizada la inyección de los fármacos y del vehículo, se dejó incubando durante 5 min, posteriormente, los ovarios fueron disecados y preservados en formalina al 10% para su posterior análisis por inmunofluorescencia.

### **Análisis de la proliferación celular *in-situ*.**

Las ratonas recibieron una inyección intrabursal del agonista no-hidrolizable UTP $\gamma$ S 100  $\mu$ M en la tarde del proestro y el ovario contralateral recibió el vehículo. Después del estímulo, las ratonas se sacrificaron en la tarde del estro esperado, se disecaron los ovarios y se preservaron en formalina a 10% para su posterior inclusión en parafina.

Posteriormente, en cortes histológicos de 10  $\mu$ m, se realizó la detección de la proteína proliferativa Ki67 mediante inmunohistoquímica (Hoffmann et al., 2008) con el kit comercial *VECTASTAIN Elite ABC-HRP* (Vector Laboratories), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Las muestras se incubaron con un anticuerpo contra Ki67 (Dilución 1:100; Cell Signaling Technology) durante toda la noche y se observaron por microscopía de campo claro (Leica Microsystems). Para el análisis, se tomaron 55 áreas por cada ovario a partir de 3 ovarios de animales distintos.

### **Población folicular.**

Con la finalidad de observar el efecto de la estimulación del receptor P2Y2 expresado en el OSE a largo plazo (1 ciclo estral), las ratonas recibieron una inyección intrabursal de 100  $\mu$ M de UTP $\gamma$ S en la tarde del proestro y se sacrificaron en la tarde del estro del siguiente ciclo estral. El ovario contralateral recibió vehículo. Cumplido el periodo planteado, los ovarios fueron removidos y preservados en formalina al 10% y embebidos en parafina.

Para el análisis folicular, se obtuvieron cortes histológicos seriados de 6  $\mu$ m que fueron teñidos en hematoxilina-eosina. El análisis de la población folicular se realizó contando el número de folículos mayores a 70  $\mu$ m, en los cortes seriados (Garrido, et al., 2018).

### **Análisis Estadístico.**

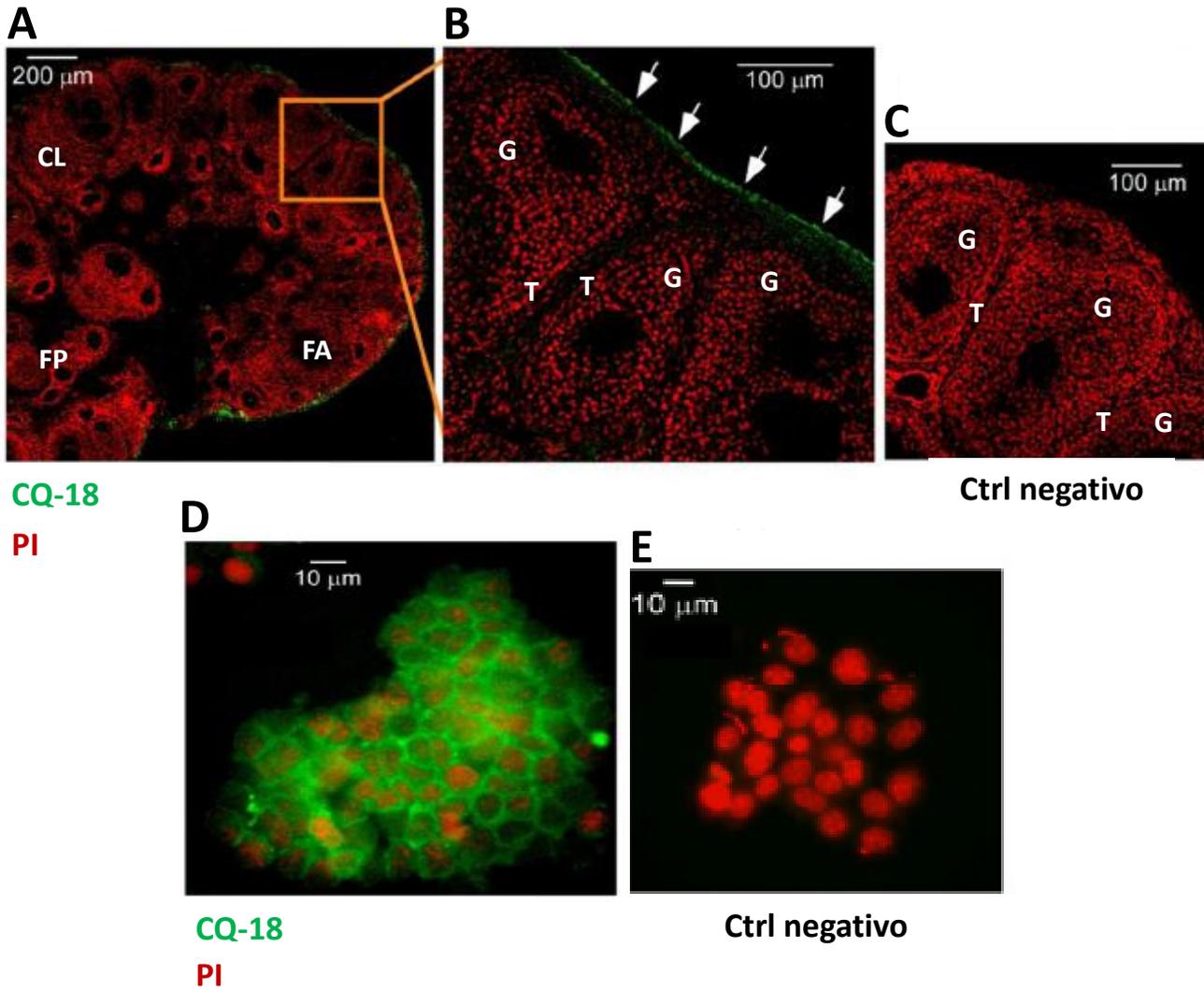
El análisis estadístico fue realizado en el programa *GraphPad Prism* (GraphPad, Inc.). Los datos analizados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar. Los grupos fueron comparados utilizando la prueba *t* de *Student* pareada y no pareada. El análisis comparativo del tamaño folicular se utilizó la prueba de Tukey. Se consideró como diferencia significativa una  $p < 0.05$ .

## **RESULTADOS**

### **La citoqueratina 18 es un marcador específico de las células del OSE.**

El presente trabajo se centró en el análisis de la expresión y la funcionalidad del receptor P2Y2 en el OSE *in-vitro* e *in-situ*. En primera instancia, nos enfocamos en identificar al OSE utilizando la expresión de la *citoqueratina 18 (CQ-18)*, un marcador característico de este tejido (Auersperg et al., 2001). Mediante ensayos de inmunofluorescencia en rebanadas de ovario de ratón, de 10 µm de espesor (**Figura 8A**), pudimos observar inmunoreactividad en una sola capa de células que bordea todo el contorno del ovario, esta monocapa corresponde al OSE (**Figura 8B**, señal verde). Como control de estos marcajes, realizamos preparaciones en las que omitimos el anticuerpo primario, pero sí incubamos con el anticuerpo secundario; en estas condiciones no observamos ninguna señal (**Figura 8C**). Estas observaciones mostraron que el marcaje con CQ-18 es altamente específico para el OSE, además demuestra que en nuestras preparaciones histológicas el OSE está debidamente conservado, dado que es común que se desprenda por la manipulación experimental. Este resultado también sugiere que la expresión de la CQ-18 puede ser utilizada para corroborar la identidad de células provenientes de esta capa en preparaciones *in-vitro*.

Con la finalidad de establecer el cultivo primario de células del OSE, los ovarios fueron tratados como se describe en la sección de "*Materiales y Métodos*", las células obtenidas se cultivaron por 6 h en superficies tratadas con colágena de la cola de rata, para evitar la diferenciación de las células epiteliales a un fenotipo fibroblástico, que no expresa marcadores epiteliales, como la citoqueratina ya que expresa marcadores mesénquimales, entre ellos, la vimentina (Hornby et al., 1992). En la **Figura 8D**, se observa un cúmulo de células, con un fenotipo epitelial, planas, organizadas en monocapa, donde la expresión de la CQ-18 resultó positiva (señal en verde), en comparación con el control negativo (**Figura 8E**). Estas observaciones confirmaron que las células aisladas corresponden a células del OSE.



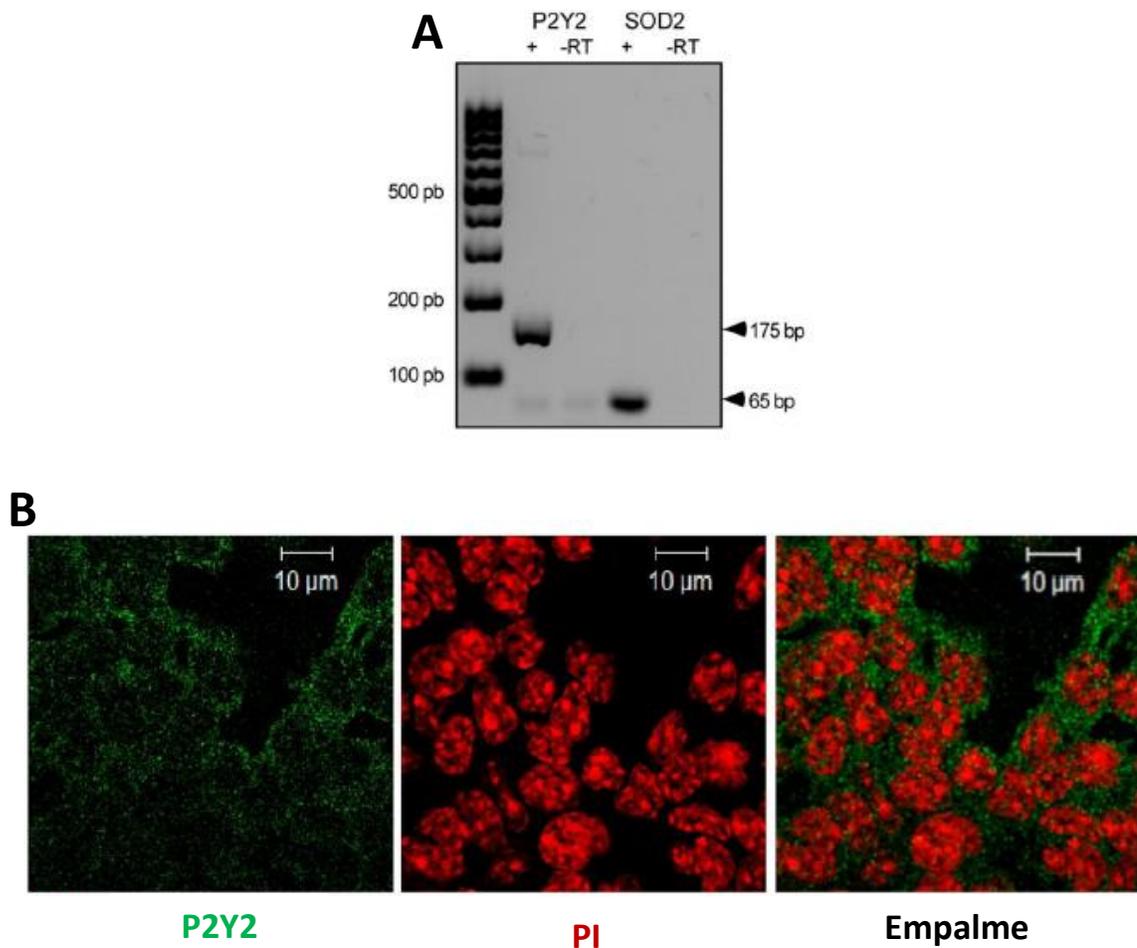
**Figura 8.** La citoqueratina 18 (CQ-18) se expresa en el OSE de ratón. La expresión de la CQ-18 fue detectada en rebanadas (10  $\mu\text{m}$ ) de ovario de ratón en el día del estro. (A) y en cultivos primarios de OSE (D). En ambos casos, los núcleos celulares fueron teñidos con yoduro de propidio (PI, señal roja) y la CQ-18 con un anticuerpo policlonal que a su vez fue detectado utilizando un anticuerpo secundario acoplado a Alexa Fluor-488 (señal verde). Los controles negativos de estos ensayos se omitió el anticuerpo primario (C y E). Las flechas en (B) señalan el OSE. Ctrl: Control, CL: cuerpo lúteo, FP: folículo primario, FA: folículo antral, T: teca y G: granulosa. A-C, N= 3 ratonas; D y E, n = 50 células de 3 ensayos independientes.

## **El receptor P2Y2 se expresa en cultivos primarios de células del OSE de ratón.**

Debido a que se ha demostrado que el receptor P2Y2 está relacionado con la inducción de proliferación y diferenciación de células de origen epitelial (Schultze-Mosgau et al., 2000), es de nuestro interés caracterizar su expresión en células del OSE.

El primer paso fue demostrar la expresión del transcrito del gen *p2ry2*, que codifica para el receptor P2Y2, en cultivos primarios de OSE, mediante transcripción reversa y PCR. Utilizando cebadores específicos obtuvimos un producto de amplificación de ~157 pb, como transcrito constitutivo amplificamos el gen de la superóxido dismutasa 2 (*Sod2*) (**Figura 9A**). Los amplicones fueron secuenciados y las secuencias fueron analizadas mediante alineamiento en la plataforma de BLAST, el transcrito de P2RY2 y el de SOD2 fueron reconocidos con los números de identificador NM\_008773 y NM\_013671, que corresponden a las secuencias nucleotídicas previamente reportadas para el receptor P2Y2 y de la SOD2 de ratón, respectivamente.

Posteriormente, analizamos la expresión del receptor P2Y2 en cultivos primarios de células del OSE por medio de inmunofluorescencia. Se observó que la inmunoreactividad estaba enriquecida en las regiones que rodean a las células, lo que sugiere que corresponde a la membrana plasmática; no obstante, en el citoplasma es posible identificar regiones positivas en forma de “clusters” (**Figura 9B**).



**Figura 9. El receptor P2Y2 se expresa en el OSE de ratón *in-vitro*.** Mediante RT-PCR (A) se detectó el transcrito del gen *p2ry2*, como producto de la reacción se observó un amplicón de 175 pb, el transcrito de *Sod2* (65 pb) se amplificó como constitutivo. El producto de amplificación de *p2yr2* fue secuenciado y su identidad confirmada en la plataforma BLAST. (B) La detección del receptor P2Y2 en el cultivo primario de células del OSE, se realizó utilizando un anticuerpo primario contra el receptor y un secundario acoplado a Alexa Fluor-488 (señal verde); los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (PI, señal roja). n = 50 células de 3 ensayos independientes.

## **El receptor P2Y2 se expresa en el OSE de ratón *in-situ*.**

Uno de los objetivos del presente estudio fue detectar la expresión del receptor P2Y2 *in-situ*, lo cual cobra relevancia porque las células epiteliales experimentan la diferenciación a una morfología fibroblástica cuando se les aísla de un órgano y se les trata de cultivar (Greenburg & Hay, 1982; Okamura et al., 2006); por lo que consideramos que una caracterización de un receptor en el OSE que refleje la fisiología era necesario realizarla *in-situ*. Así, iniciamos documentando la expresión del receptor P2Y2 por inmunofluorescencia en rebanadas de ovario de ratón.

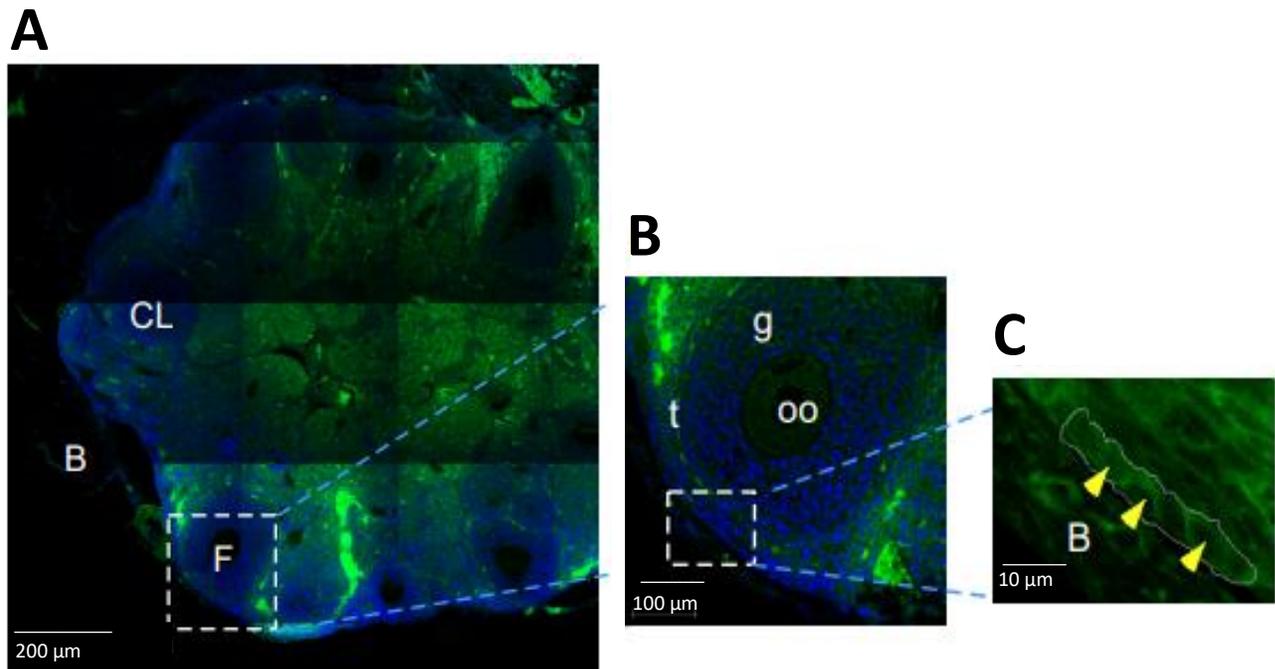
Uno de los problemas prácticos que surgen en este tipo de aproximaciones es que el OSE es susceptible al desprendimiento mecánico durante el procesamiento histológico, lo cual fue subsanado realizando los cortes sin retirar la bursa ovárica, en estas condiciones el OSE se preserva en toda la superficie ovárica (**Figura 10**).

En las imágenes de inmunofluorescencia detectamos el inmunomarcaje del receptor P2Y2 en distintos elementos intraováricos, como en las células de la teca y de la granulosa que conforman el folículo, lo cual ya ha sido descrito recientemente en el ovario de rata (Campos-Contreras et al., 2019), en las células de los cuerpos lúteos, en distintas zonas del estroma y en el OSE.

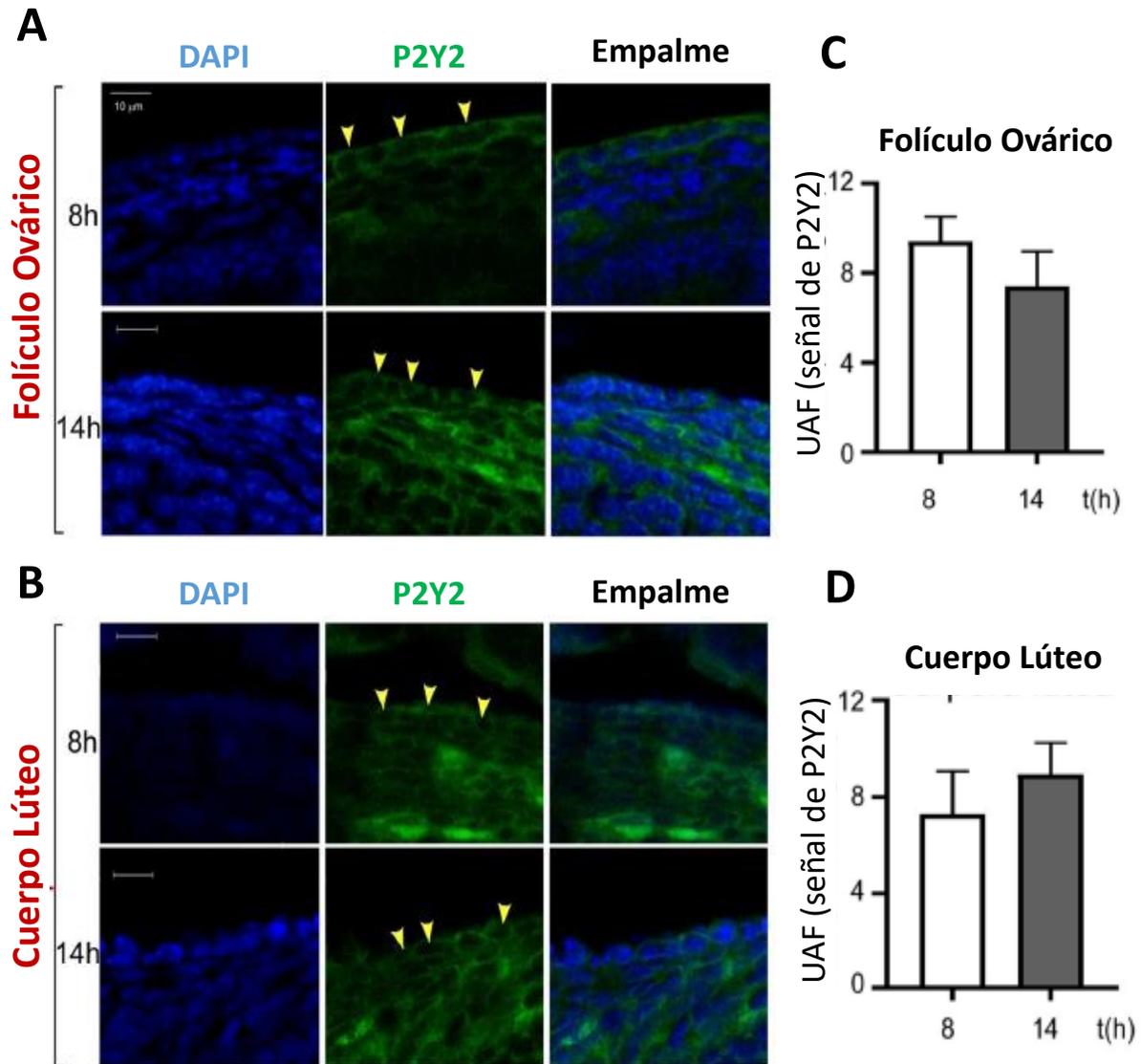
Para realizar un análisis sistemático de las imágenes de inmunofluorescencia, primero adquirimos una imagen panorámica de la rebanada (**Figura 10A**). A partir de dicha imagen, se adquirieron fotografías de regiones discretas del OSE adyacentes a folículos ováricos y a cuerpos lúteos (**Figura 10B-C**). Con el fin de analizar si estos elementos intraováricos tienen influencia en la expresión del receptor P2Y2 en las células del OSE.

El análisis de la expresión del receptor P2Y2 se llevó a cabo en dos momentos del día del estro: a las 8 h, correspondiente al punto cercano de la ovulación y a las 14 h, posterior a la ovulación. En todas las condiciones se obtuvo una estimación del nivel de inmunoreactividad del receptor P2Y2. Las regiones de interés se determinaron al elegir cada célula y fue normalizado con respecto a las regiones de interés de las células del grupo control. Cada región de interés normalizado fue cuantificada como célula única y expresado como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) (**Figura 11A-B**), al

comparar los niveles de expresión en las imágenes. no se observó diferencia entre las 8 y las 14 horas en regiones del OSE adyacentes a folículos (**Figura 11C**) ( $9.4 \pm 1.09$  vs  $7.4 \pm 1.55$  UAF, para 8 y 14 h respectivamente) o en regiones del OSE adyacentes a cuerpos lúteos (**Figura 11D**) ( $7.2 \pm 1.78$  vs  $8.9 \pm 1.30$  UAF, para 8 y 14 h respectivamente).



**Figura 10. El receptor P2Y2 se expresa en el OSE de ratón *in-situ*.** La imagen panorámica (A) muestra la rebanada del ovario con los distintos elementos intraováricos el día del estro. La bursa se preservó para mantener la integridad del OSE. En un acercamiento (B) se observa el OSE adyacente a un folículo ovárico, cuya señal en verde (Alexa Fluor-488) corresponde a la inmunodetección del receptor P2Y2. Las cabezas de flecha amarillas (C) señalan las células del OSE; los núcleos fueron teñidos con 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI, señal azul). B: bursa, CL: cuerpo lúteo, F: folículo ovárico, t: teca, g: granulosa, OO: ovocito. El análisis cuantitativo se llevó a cabo en ~500 células de cada una de las condiciones en 3 ensayos independientes.



**Figura 11. La expresión del receptor P2Y2 en el OSE adyacente a folículos o cuerpos lúteos, es similar a las 8 y 14h del día del estro.** Inmunodetección del receptor P2Y2 en las células del OSE adyacente a un folículo ovárico (A) o a un cuerpo lúteo (B) a las 8 h (preovulación) y a las 14 h (postovulación) el día del estro. Las imágenes fueron adquiridas a mayor magnificación. El inmunomarcaje del receptor P2Y2 corresponde a la señal en verde (Alexa Fluor-488) y los núcleos fueron teñidos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, señal azul). Las cabezas de flecha amarillas señalan a las células del OSE. La fluorescencia promedio fue expresada en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF), tal como se observa en las gráficas (C-D). El análisis cuantitativo se llevó a cabo en ~500 células de cada una de las condiciones en 3 ensayos independientes.

## La estimulación de células del OSE *in-vitro* e *in-situ* induce cambios en la concentración intracelular de calcio.

Una vez descrito que el receptor P2Y2 se expresa *in-vitro* e *in-situ*, se prosiguió en analizar si el receptor detectado es funcional. Para contestar esta pregunta, seguimos 2 estrategias: (1) mediante cambios en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  por microscopía de fluorescencia y (2) a través del análisis de la fosforilación de ERK, un efector bien descrito de los receptores P2Y2 (Campos-Contreras et al., 2019; Luke & Hexum, 2008; Vázquez-Cuevas et al., 2010).

Las rebanadas de ovario (**Figura 12A**), fueron cargadas con un sensor fluorométrico, el Fluo 4-AM, donde el incremento de fluorescencia se interpretó como cambios en la concentración de calcio intracelular, siguiendo una escala de pseudo color: una señal azul (menor intensidad de fluorescencia), y la señal roja (mayor intensidad de fluorescencia).

El estímulo con ATP (100  $\mu\text{M}$ ) indujo un incremento en la intensidad de la fluorescencia (señal roja), en la periferia, que corresponde al OSE (**Figura 12A**, línea punteada), dando una respuesta característica de los receptores P2Y acoplados a la proteína Gq y activan la vía canónica Gq/PLC/IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup>: un rápido incremento y el descenso a lo largo del tiempo (2.5 minutos). Asimismo, el incremento en la intensidad de la fluorescencia fue observada en varias regiones del ovario como las células de la granulosa y de la teca.

Para determinar la amplitud máxima de las señales y analizar su curso temporal, se graficaron la intensidad de la fluorescencia en función del tiempo. Las respuestas inducidas por ATP y UTP presentaron una cinética similar (**Figura 12B**): la respuesta alcanza su nivel máximo en aproximadamente 10 segundos y cae al nivel basal en aproximadamente 20 segundos.

El receptor P2Y2 de ratón tiene una sensibilidad equiparable al ATP y al UTP (**Tabla 2**), este último, es un agonista que activa a los receptores P2Y2 y P2Y4 (King et al., 1998; von Kügelgen & Harden, 2011). El estímulo con 10  $\mu\text{M}$  ( $479 \pm 19\%$  UAF del basal), o con 100  $\mu\text{M}$  ( $627 \pm 37\%$  UAF del basal), de UTP en rebanadas de ovario, generó

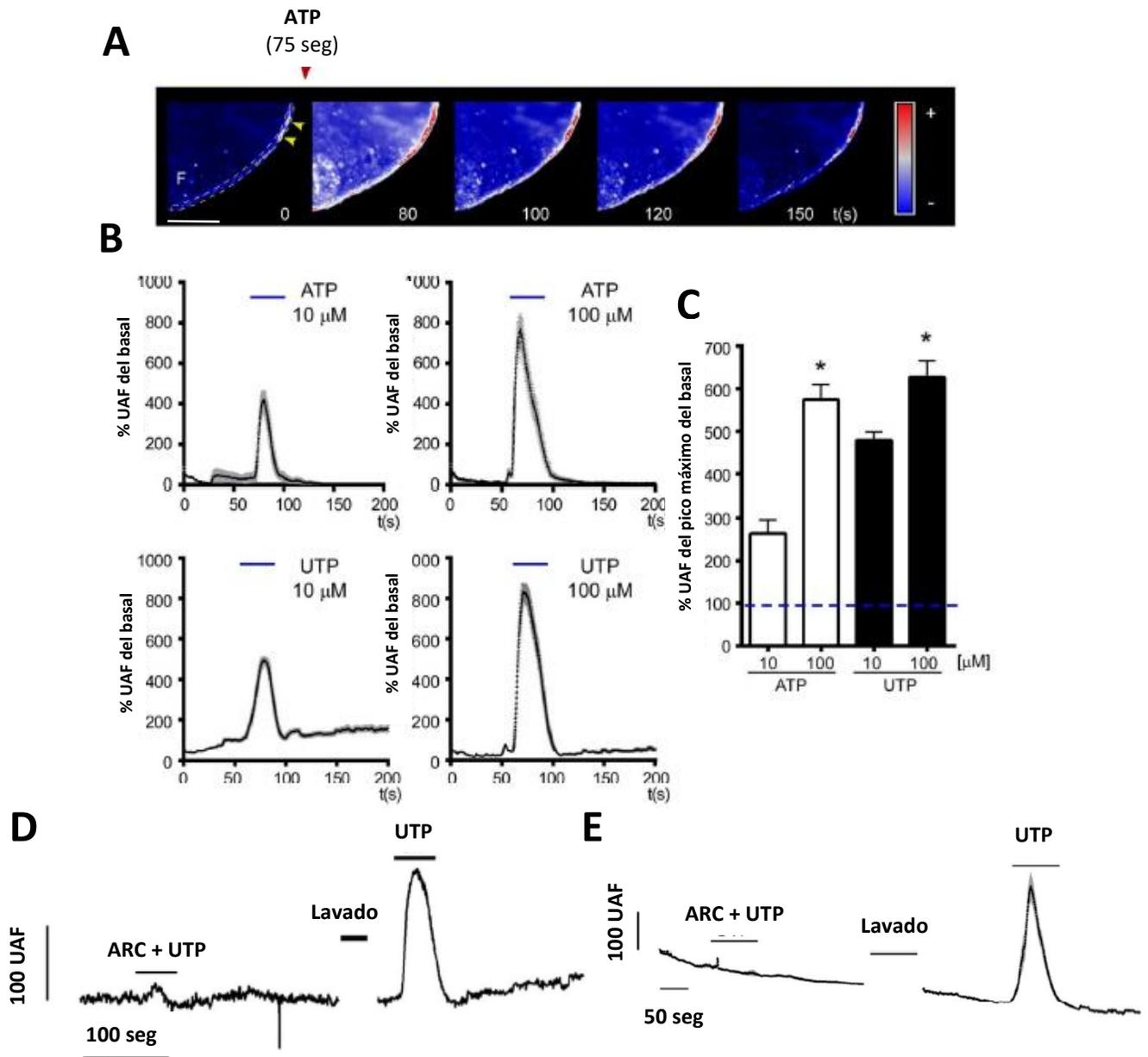
una respuesta monofásica, cuya amplitud fue semejante a la que se obtiene con 10  $\mu\text{M}$  ( $263 \pm 31\%$  UAF del basal), y 100  $\mu\text{M}$  de ATP ( $574 \pm 35\%$  UAF del basal) (**Figura 12C**).

Como mencionamos, el UTP es también un agonista de los receptores P2Y4, con el fin de discernir su contribución en esta respuesta, utilizamos el antagonista selectivo de P2Y2, ARC-118925 ( $\text{IC}_{50} = 1 \mu\text{M}$ ) (Rafehi et al., 2017). La presencia del antagonista abolió la respuesta inducida por UTP, mostrando que la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular depende principalmente de la actividad del receptor P2Y2 (**Figura 12D**).

Otra evidencia que respalda estos resultados *in-situ*, fueron los registros realizados en cultivos primarios de células del OSE (**Figura 12E**). Por estimulación con 100  $\mu\text{M}$  de UTP, se genera la respuesta que caracteriza a los receptores P2Y ( $502.5 \pm 56\%$  UAF del incremento basal), que previamente se ha reportado (Vázquez-Cuevas, et al., 2013), y mencionado en la sección de *Antecedentes*.

De igual manera a lo mostrado en los registros en las rebanadas de ovario, la respuesta inducida por UTP en las células fue abolida por la incubación con el antagonista selectivo de P2Y2, ARC-118925 (**Figura 12E**), indicando que la respuesta se atribuye principalmente a dicho receptor.

Los experimentos anteriores demostraron que el OSE expresa receptores P2Y2 funcionales.



**Figura 12.** La estimulación *in-vitro* e *in-situ* de las rebanadas de ovario con ATP o UTP induce el incremento del  $[Ca^{2+}]_i$  en el OSE. La rebanada de ovario (A) muestra una respuesta característica de dinámica de calcio a lo largo del tiempo. La flecha roja señala el momento de aplicación del estímulo. La imagen se muestra en pseudo color que corresponde a la intensidad de la señal. La línea punteada indica al OSE. Los cursos temporales de las respuestas generadas al estimular al OSE con ATP o UTP (B) son dependientes de la concentración del agonista. La barra horizontal representa la aplicación del agonista. Las gráficas (C) muestran la amplitud promedio de la respuesta generada por ATP o UTP a 10 y 100  $\mu$ M. La línea punteada en azul indica el nivel basal (D) y (E): El inhibidor de los receptores P2Y2, ARC-118925 a 10  $\mu$ M inhibe los incrementos en fluorescencia inducidos por 100  $\mu$ M de UTP en rebanadas de ovario (D) y en cultivo primario de células del OSE (E). Para A-D, N = 6 ratonas, 50 células de cada rebanada de ovario; para E, N = 3 ratonas, n = 50 células de 3 ensayos independientes. Para A, barra de escala: 100  $\mu$ m.

## La estimulación de células del OSE *in-situ* induce cambios en los niveles de fosforilación de las ERK

Con el fin de documentar si en el OSE, la activación del receptor P2Y2 induce la fosforilación de las ERK, efectores bien caracterizados de dichos receptores en otros tipos celulares (Chadet et al., 2014; Chambard et al., 2007; W. H. Li et al., 2015; Tackett et al., 2014; Velázquez-Miranda et al., 2020), analizamos el efecto de la estimulación purinérgica del OSE *in-situ*, sobre el estado de fosforilación de dichas cinasas, en aquellas células del OSE adyacentes a elementos intraováricos, como a un folículo ovárico o a un cuerpo lúteo, debido a que se ha reportado que existe influencia de estos elementos sobre las células del OSE (Gaytán et al., 2005). Así, el OSE de ratonas cíclicas fue estimulado con 100  $\mu$ M de UTP por 5 minutos, por medio de inyecciones intrabursales, a las 8 h y a las 14 h durante la etapa del estro. El ovario contralateral recibió el vehículo.

Inicialmente, nos propusimos evaluar si además de detectar un aumento en el nivel de fosforilación de las ERK, las cinasas se translocaban al núcleo. Según lo observado en la proyección ortogonal (**Figura 13A**), la línea verde que corresponde a la proyección ortogonal 1 (PO1), cruza con la línea anaranjada correspondiente a la proyección ortogonal 2 (PO2), dando la colocalización de ambas señales (p-ERK, señal en verde; núcleo, señal en rojo), debido al estímulo con UTP promoviendo así que una fracción de las ERK fosforiladas se transloca al núcleo (**Figura 13**, cabezas de flecha amarillas), poniendo en evidencia su posible papel en la expresión de genes.

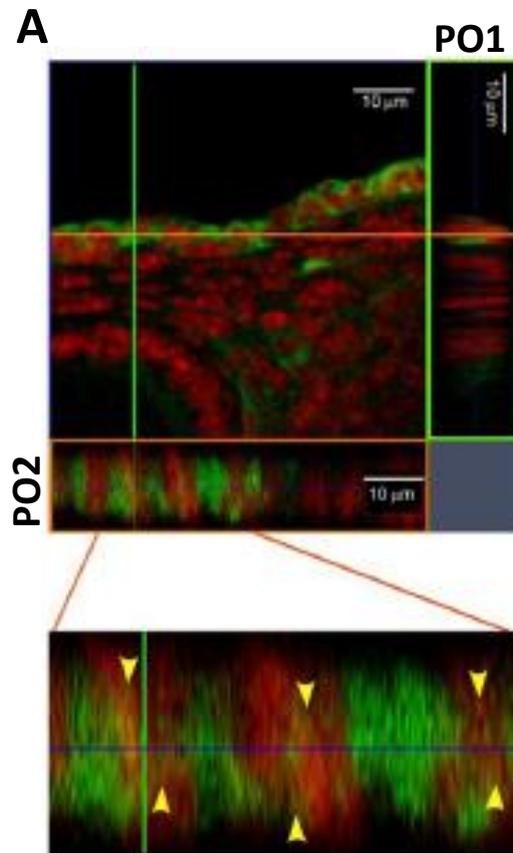
El nivel de fosforilación de las ERK fue cuantificado a las 8 y a las 14 h durante la etapa del estro, en respuesta al estímulo con UTP (100  $\mu$ M) en las células del OSE adyacentes a un folículo ovárico (**Figura 14**) y adyacentes a un cuerpo lúteo (**Figura 15**), estableciendo cada célula como una región de interés con respecto al control, normalizado y expresado en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF).

En células del OSE adyacentes a un folículo ovárico (**Figura 14A**) la inyección de UTP indujo incrementos significativos en las ERK fosforiladas en ambos momentos evaluados (**Figura 14B**) ( $4.6 \pm 0.54$  vs  $19.3 \pm 5.3$  UAF a las 8h para los vehículos y estimulados con UTP, respectivamente,  $p < 0.05$ ; y  $1.04 \pm 0.48$  vs  $23.9 \pm 5.85$  UAF a las

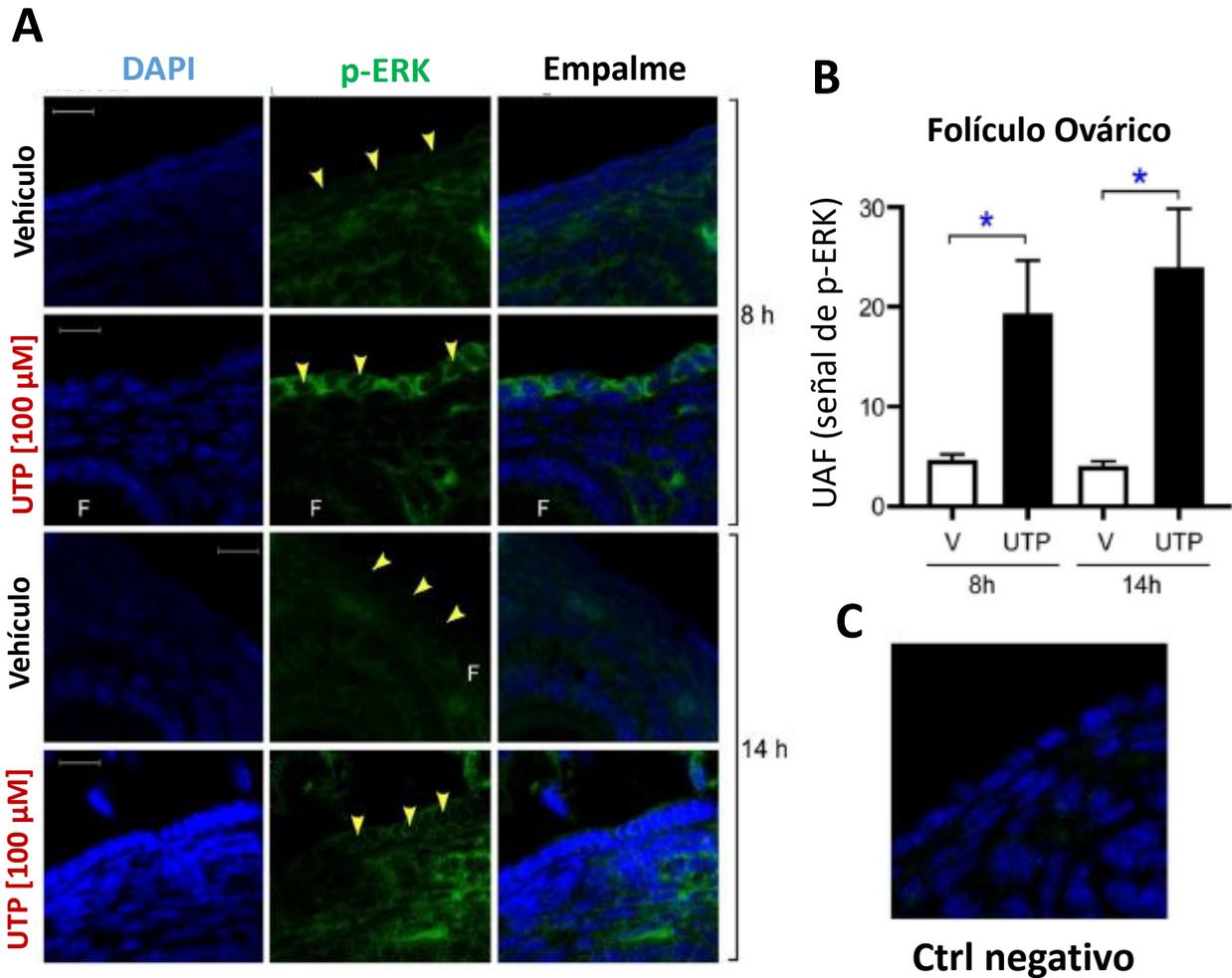
14 h para los vehículos y estimulados con UTP, respectivamente,  $p < 0.05$ ), comparado con el control (**Figura 14C**). Entre las 8 y las 14 h, no se encontraron diferencias en la magnitud de los incrementos.

Aunque los niveles de fosforilación de ERK inducidos por UTP fueron mayores en regiones del OSE adyacentes a un cuerpo lúteo (**Figura 15A**), el patrón fue el mismo que el descrito anteriormente (**Figura 15B**) ( $10.8 \pm 2.7$  vs  $21.6 \pm 3.01$  UAF a las 8 h para los vehículos y estimulados con UTP, respectivamente,  $p < 0.05$ ; y  $8.6 \pm 2.32$  vs  $24.9 \pm 3.42$  UAF a las 14 h para los vehículos y estimulados con UTP, respectivamente,  $p < 0.05$ ), comparado con el control (**Figura 15C**).

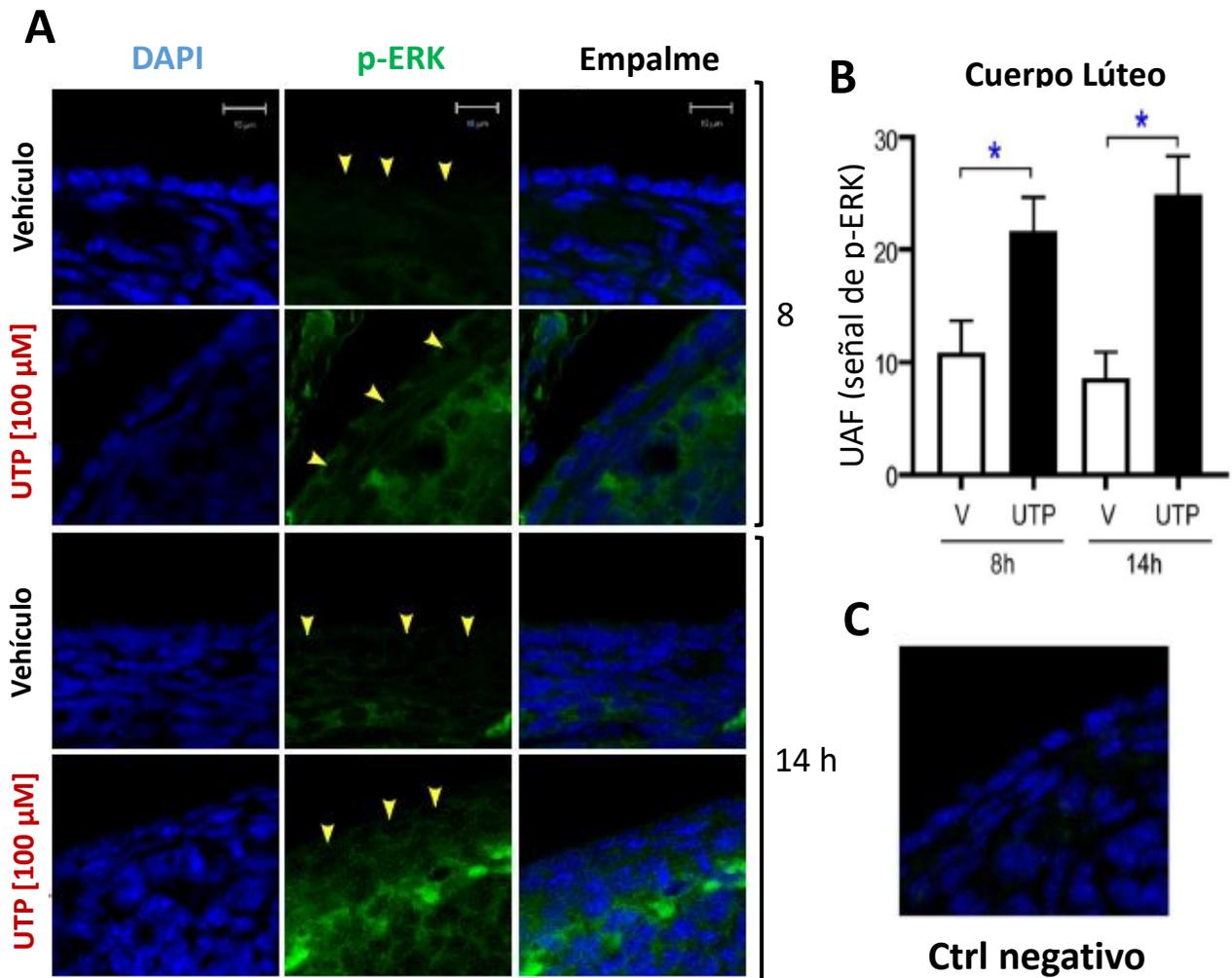
Nuestras observaciones demuestran que el receptor P2Y<sub>2</sub>, además de inducir cambios en la concentración de calcio intracelular, también es capaz de activar a las cinasas ERK, sugiriendo que la maquinaria molecular se encuentra lista para utilizarse en un momento dado, durante un evento fisiológico en el OSE.



**Figura 13. La administración intrabursal de UTP induce la fosforilación de ERK en las células del OSE.** La imagen (A) corresponde a la inmunolocalización de la proteína ERK fosforilada (p-ERK, señal verde). Las proyecciones ortogonales (PO1 y PO2) evidencian la translocación de la proteína ERK (cabezas de flecha amarillas) en el núcleo (señal en rojo), como se observa en la ampliación de la imagen inferior. El análisis cuantitativo se llevó a cabo en ~500 células de cada una de las condiciones en 3 ensayos independientes.



**Figura 14.** El UTP genera un incremento de la señal de ERK fosforilado en las células del OSE adyacente a folículos ováricos. La imagen (A) muestra la señal de la presencia de ERK fosforilado (p-ERK, señal verde) de los ovarios estimulados con UTP a 100 μM durante 5 min. a las 8 h (preovulación) y a las 14 h (postovulación) el día del estro, en comparación con la señal emitida por los vehículos. Las cabezas de flecha amarillas señalan a las células del OSE. Los núcleos fueron teñidos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, señal azul). En el control negativo se omitió el anticuerpo primario (C). La gráfica (B) muestra el promedio de la fluorescencia expresada en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) de ~500 células del OSE adyacentes a los folículos ováricos de cada condición de 3 experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , prueba t de Student, pareada.



**Figura 15. El UTP genera un incremento de la señal de ERK fosforilado en las células del OSE adyacente a cuerpos lúteos.** La imagen (A) muestra la señal de la presencia de ERK fosforilado (p-ERK, señal verde) de los ovarios estimulados con UTP a 100 μM durante 5 min. a las 8 h (preovulación) y a las 14 h (postovulación) el día del estro, en comparación con la señal emitida por los vehículos. Las cabezas de flecha amarillas señalan a las células del OSE. Los núcleos fueron teñidos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, señal azul). En el control negativo se omitió el anticuerpo primario (C). La gráfica (B) muestra el promedio de la fluorescencia expresada en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) de ~500 células del OSE adyacentes a los cuerpos lúteos de cada condición de 3 experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , prueba t de Student, no pareada.

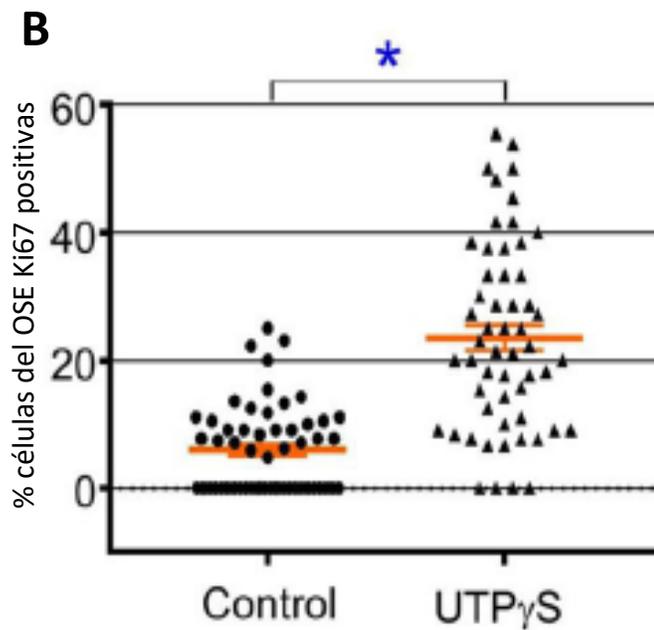
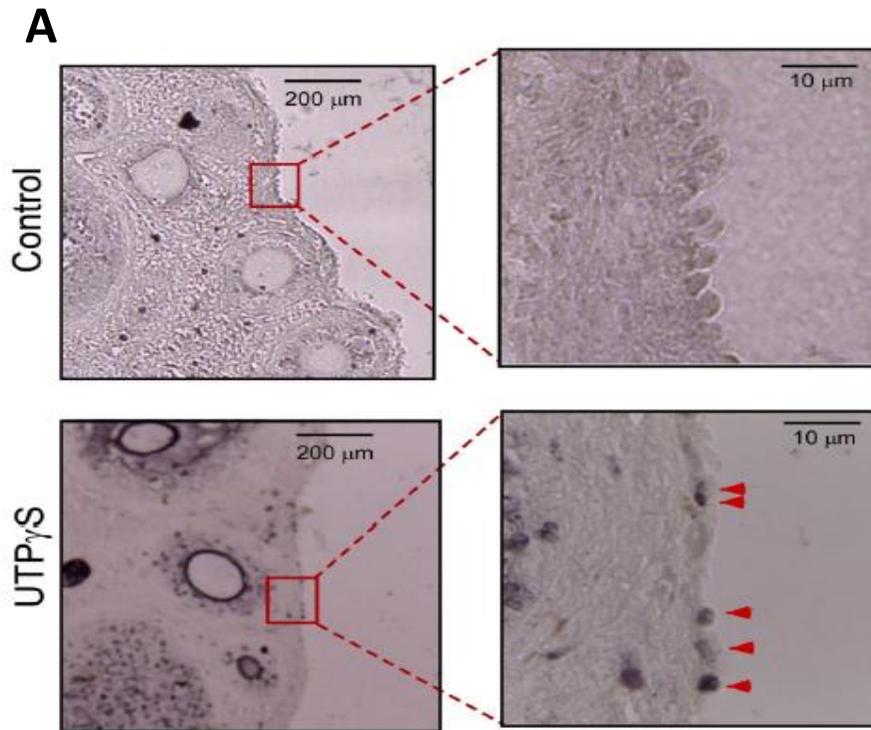
## La activación del receptor P2Y2 induce la proliferación celular en el OSE.

Una vez establecido que el receptor P2Y2 se expresa y es funcional en las células del OSE, exploramos su papel en eventos celulares. Se ha reportado que el receptor P2Y2 está involucrado en diversos procesos celulares, entre ellos, la proliferación de diversos tejidos (Vázquez-Cuevas et al., 2010; Vázquez-Cuevas, et al., 2013), así como en líneas celulares derivadas del OSE (K.-C. Choi et al., 2003; Schultze-Mosgau et al., 2000).

Para explorar un posible papel del receptor P2Y2 en la proliferación celular del OSE *in-situ*, se realizó la inyección Intrabursal de UTP $\gamma$ S a 100  $\mu$ M, este ligando es un análogo no hidrolizable del UTP, por lo que se previene su posible degradación. El agonista se administró durante la tarde de la etapa del proestro y 24 h post inyección, se evaluó mediante inmunohistoquímica la expresión de Ki67, una proteína asociada a la proliferación celular en cortes histológicos de ovario.

En los cortes histológicos de ovario (**Figura 16A**), se aprecia inmunoreactividad a la proteína Ki67 en las células del OSE que recibieron el estímulo de UTP $\gamma$ S. Las cabezas de flecha rojas indican la señal en la periferia del ovario, comparado con el control. También, podemos observar inmunoreactividad en los folículos ováricos y en cuerpos lúteos, así como en algunas regiones del estroma.

En estos experimentos, pudimos observar que la administración de UTP $\gamma$ S induce claramente un incremento en la expresión de Ki67 ( $23.5 \pm 2.0$  % de células del OSE positivas a Ki67), comparado con el ovario control ( $6.0 \pm 0.9$  % de células del OSE positivas a Ki67) (**Figura 16B**), indicando así que la estimulación farmacológica de receptor P2Y2 puede promover la proliferación celular *in-situ*.



**Figura 16. La estimulación farmacológica del receptor P2Y2 induce la proliferación celular a corto plazo en el OSE.** En ratonas cíclicas recibieron una inyección intrabursal de UTP $\gamma$ S en la tarde del proestro. La imagen (A) muestra los cortes histológicos donde en los acercamientos señalan inmunoreactividad a Ki67 en algunas células del OSE (cabezas de flecha rojas), comparado con el control. La gráfica en (B) muestra el porcentaje de células del OSE positivas al marcador de Ki67 de 55 áreas por ovario de 3 ensayos independientes. \* $p < 0.05$ , prueba t de Student, pareada,

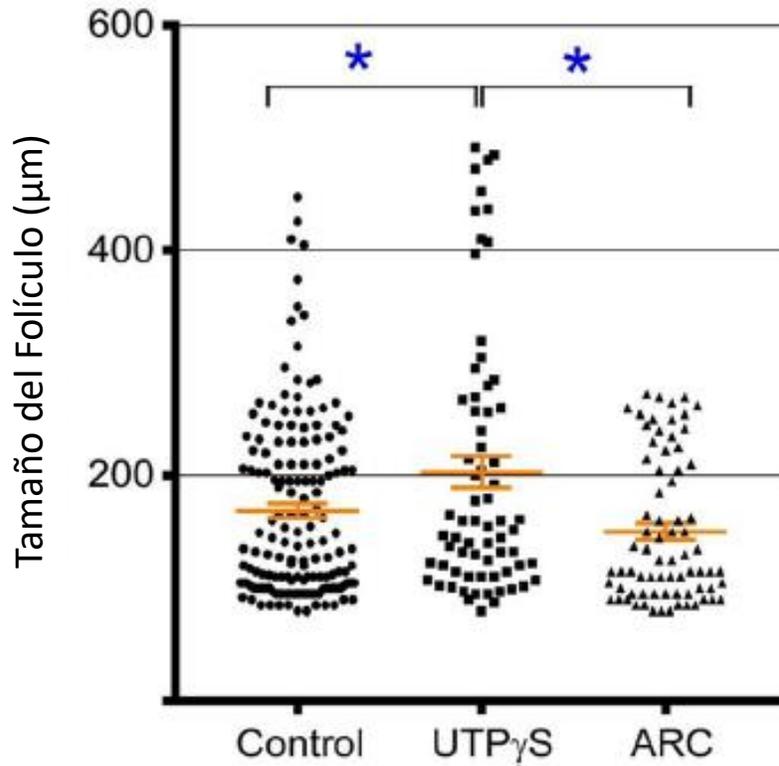
## La estimulación del receptor P2Y2 a largo plazo induce cambios en la población folicular.

La información acerca de la relación entre la señalización purinérgica y la fisiología ovárica es limitada, la relación entre la influencia purinérgica como un posible mecanismo paracrino-autocrino entre el OSE sobre la fisiología ovárica no se ha abordado.

Para conocer el posible papel fisiológico del receptor P2Y2 sobre el desarrollo folicular, realizamos la estimulación farmacológica del ovario a través de la administración intrabursal del agonista no hidrolizable UTP $\gamma$ S (100  $\mu$ M) o el antagonista selectivo del receptor P2Y2, ARC-118925 (10  $\mu$ M) en la mañana del estro y se dejó transcurrir un ciclo estral (4 días). Al ovario contralateral se le administró el vehículo como control. Transcurrido los 4 días, se realizaron cortes histológicos seriados para observar la distribución del tamaño de los folículos ováricos y el efecto de la administración farmacológica en la población folicular. Se cuantificaron al microscopio, todos los folículos mayores a 70  $\mu$ m.

Al estimular con UTP $\gamma$ S, se observó un incremento significativo en el tamaño medio de los folículos ováricos (169  $\pm$  9 vs 203  $\pm$  14  $\mu$ m de diámetro para los controles y los estimulados con UTP $\gamma$ S, respectivamente,  $p = 0.018$ ). Por otra parte, en los ovarios que recibieron ARC-118925 el tamaño medio de los folículos disminuyó significativamente (150  $\pm$  7 vs 203  $\pm$  14  $\mu$ m de diámetro para los tratados con ARC-118925 y estimulados con UTP $\gamma$ S, respectivamente,  $p = 0.0009$ ) (**Figura 17**).

Este análisis refleja el impacto de la estimulación purinérgica en el crecimiento folicular, como un primer enfoque en la fisiología ovárica.

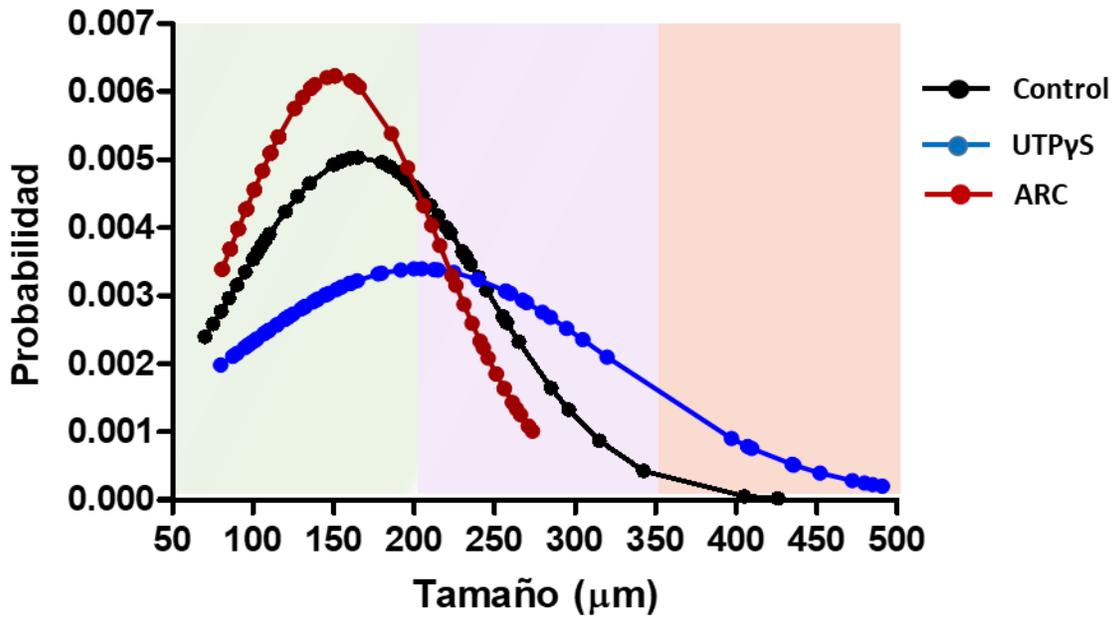


**Figura 17. La estimulación farmacológica del receptor P2Y2 genera cambios en la población folicular durante un ciclo estral.** En ratonas cíclicas recibieron una inyección intrabursal de UTP $\gamma$ S (100  $\mu$ M) ó de ARC-118925 (10  $\mu$ M) en la tarde del estro. Transcurrido un ciclo estral (4 días), se obtuvieron los ovarios y se analizó la población folicular en cortes seriados. La gráfica muestra el incremento en los folículos ováricos mayores a 70  $\mu$ m de los ovarios de aquellas ratonas estimuladas con UTP $\gamma$ S, comparado con el control. Sin embargo, el tamaño de la población folicular disminuye en aquellas estimuladas con ARC-118925. \*p < 0.05, prueba de Tukey, N= 5 ratonas controles; 3 ratonas estimuladas con UTP $\gamma$ S ó ARC.

Con la finalidad de explorar la distribución de la población folicular de los ovarios con cada tratamiento (UTP $\gamma$ S, ARC-118925 y control), se ajustaron los datos de los tamaños de los folículos a una distribución normal (**Figura 18**).

La gráfica muestra la distribución de los tamaños de los folículos ováricos en animales tratados con UTP $\gamma$ S (gráfico azul) y ARC-118925 (gráfico rojo), en comparación con el grupo control (gráfico negro). En aquellos animales tratados con UTP $\gamma$ S ( $203 \pm 14 \mu\text{m}$  de diámetro folicular medio), se observa una población de folículos ováricos  $>400 \mu\text{m}$  (gráfico azul, región color rosa), comparado con el control ( $169 \pm 9 \mu\text{m}$  de diámetro folicular medio). Sin embargo, la población de folículos ováricos de ratonas tratadas con ARC-118925 ( $150 \pm 7 \mu\text{m}$  de diámetro folicular medio), disminuye y se mantiene en la región  $>200 \mu\text{m}$  (gráfico rojo, región color malva), comparado con los tratados con UTP $\gamma$ S.

Este análisis refleja el impacto de la estimulación purinérgica en el crecimiento folicular y sugiere que la actividad del receptor P2Y2 regula positivamente el crecimiento folicular favoreciendo la formación de una cohorte de folículos preovulatorios  $>400 \mu\text{m}$ . Este resultado puede ser el inicio de la descripción de un nuevo mecanismo de regulación del crecimiento folicular mediado por nucleótidos extracelulares.



**Figura 18.** La estimulación farmacológica del receptor P2Y2 altera la distribución de la población folicular durante un ciclo estral. En ratonas cíclicas recibieron una inyección intrabursal de UTPyS (100 μM) ó de ARC-118925 (10 μM) en la tarde del estro. Transcurrido un ciclo estral (4 días), se obtuvieron los ovarios y se analizó la distribución de los tamaños de los folículos ováricos en cortes seriados. La gráfica muestra el incremento de la población de folículos ováricos >400 μm en las ratonas estimuladas con UTPyS (gráfico azul, región rosa), comparado con el control (gráfico negro). Sin embargo, en las ratonas estimuladas con ARC-118925 (gráfico rojo), la población folicular disminuye y se mantiene en un tamaño >200 μm (región malva), comparado con los tratados con UTPyS.

## **DISCUSIÓN**

Los procesos intraováricos son regulados primordialmente por el sistema neuroendocrino y por una compleja red de factores locales como, citocinas, factores de crecimiento y neurotransmisores (Atwood & Vadakkadath Meethal, 2016; Strauss & Williams, 2018), en este contexto se ha comenzado a describir efectos reguladores de las purinas extracelulares en células del folículo ovárico (Martínez-Ramírez & Vázquez-Cuevas, 2015).

La señalización purinérgica ovárica se ha descrito en los últimos años como un importante sistema de comunicación paracrina-autocrina (Díaz-Muñoz et al., 2019; Martínez-Ramírez & Vázquez-Cuevas, 2015). Aunque aún no se entiende con claridad su papel fisiológico, diversos reportes han evidenciado la expresión de receptores purinérgicos en las células somáticas que conforman el folículo ovárico; su modulación farmacológica ha revelado la capacidad de regular diversos procesos celulares. Así, se sabe que los receptores P2Y2 ejercen acciones anti-gonadotrópicas, modulando la formación de AMPc inducido por la LH en células de la granulosa luteinizadas (Tai et al., 2001). Por otra parte, nuestro grupo de trabajo ha mostrado que las células de la teca expresan receptores P2Y2, P2Y4 y P2Y6, y que su activación induce la fosforilación de las ERK y promueve proliferación celular (Vázquez-Cuevas et al., 2010). Además se ha de mostrado la expresión de receptores purinérgicos en células de la granulosa-luteales (Bao et al., 2017; C.-J. Tai et al., 2001; C. J. Tai, Kang, Choi, et al., 2001), células del cúmulo (Arellano et al., 2002) y en el OSE (Vázquez-Cuevas, et al., 2013).

Dado que el OSE despierta un gran interés biológico, debido a su papel en la ruptura y reparación de la superficie del ovario durante el proceso ovulatorio (Ng & Barker, 2015), y la importancia biomédica debido a su susceptibilidad a desarrollar neoplasias, ya que el 90% de los cánceres ováricos son de origen epitelial (Auersperg, 2011).

Resultó de nuestro interés caracterizar con detalle la expresión del receptor P2Y2, un receptor que ha sido relacionado con la proliferación celular en distintos tejidos (Brunschweiler & Müller, 2006; Rafehi & Müller, 2018), y que, además, se sabe que regula la transición epitelio-mesénquima (TEM), subyace al proceso metastásico en células de cáncer epitelial de diferentes orígenes como próstata (Li et al., 2015),

estómago (Reyna-Jeldes et al., 2021) y ovario (Martínez-Ramírez et al., 2016). Es en este contexto que consideramos pertinente la caracterización de los receptores P2Y2 en el OSE.

En un estudio previo, se caracterizó al receptor P2X7 en el OSE (Vázquez-Cuevas, et al., 2013); como resultado colateral, en dicho trabajo se observó la posible expresión de un receptor responsivo a ATP extracelular en una concentración relativamente baja (10  $\mu$ M), cuyo cambios en la concentración  $Ca^{2+}$  intracelular no era afectado a la presencia o ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular, sugiriendo la expresión de un receptor purinérgico de la subfamilia P2Y, acoplado a la vía de señalización Gq/PLC/IP<sub>3</sub>. Por otra parte, en estudios realizados en cultivos primarios de OSE de ratón, documentamos que el estímulo con UTP inducía respuestas vigorosas de incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  (Lara-Mejía 2014). Considerando nuestras evidencias dedujimos que el OSE expresa receptores P2Y2 ó P2Y4 acoplados a su vía canónica de señalización.

El estudio de los epitelios es complejo, debido a que el contacto con superficies rígidas y poco laxas de las placas de cultivo, induce la transición epitelio-mesénquima (TEM), un proceso donde las células epiteliales se transforman en un fenotipo mesénquimal similar a los fibroblastos (Greenburg & Hay, 1982). Aunque existen estudios previos analizando respuestas relacionadas con el receptor P2Y2, estos se han realizado en células transformadas probablemente derivadas del OSE, tales como OVCAR-3 (Popper & Batra, 1993), SKOV-3 (Batra, Satish; Fadeel, 1994), EFO-21 y EFO-27 (Schultze-Mosgau et al., 2000) y IOSE-29 (Choi, K.-C., et al., 2002). Estas líneas celulares muestran distintos niveles de transformación y no reflejan la fisiología del OSE. El presente estudio analizó la expresión espacio-temporal del receptor P2Y2 en el OSE durante la etapa del estro *in-situ*, con la finalidad de tener un acercamiento experimental más cercano a la fisiología.

Inicialmente, analizamos la expresión del receptor P2Y2 en cultivos primarios de OSE de ratón. Para este experimento, se sembraron células de OSE de un cultivo primario en una matriz de colágeno durante 6 h para prevenir la diferenciación celular. De manera consistente, la expresión del receptor P2Y2 en este modelo fue detectado por inmunofluorescencia, la presencia del transcrito *p2yr2* por RT-PCR y la funcionalidad se

demonstró por los cambios en la dinámica de  $[Ca^{2+}]_i$  al estimular con agonistas purinérgicos. Estos hallazgos confirman la presencia funcional del receptor P2Y2 en las células del OSE cultivadas.

Posteriormente, se procedió a analizar la expresión de este receptor en el OSE *in-situ*, para tal fin, se obtuvieron preparaciones en las que se mantenía la integridad del ovario. Mediante inmunofluorescencia, se observó la señal consistente de la presencia del receptor P2Y2 en la monocapa correspondiente al OSE. Las respuestas de  $Ca^{2+}$  presentaron las siguientes características: 1) Fueron inducidas con potencias similares por ATP y UTP, 2) fueron dependientes de la concentración, 3) La cinética de las respuestas obtenidas es similar a las observadas en cultivos primarios de OSE, un incremento rápido y robusto, pero transitorio, 4) La pre incubación de las rebanadas de ovario con ARC-118925 abolió las respuestas inducidas por UTP. En resumen, los registros de  $Ca^{2+}$  en las rebanadas de ovario apoyan la idea de que la respuesta es mediada por el receptor P2Y2.

Por otro lado, utilizamos inyecciones intrabursales con el fin de estimular específicamente a las células del OSE, la inyección de UTP (100  $\mu$ M) durante 5 min, induce la fosforilación de ERK en el OSE, un conocido efector del receptor P2Y2 (Vázquez-Cuevas et al., 2010). El análisis de las proyecciones ortogonales en imágenes obtenidas por microscopía confocal, se observó que una proporción significativa de las ERK fosforilada se transloca al núcleo.

Continuando con el análisis de la funcionalidad del receptor en el OSE, también observamos el inmunomarcaje del receptor P2Y2 en las células de dicho epitelio en 2 puntos de la etapa del estro: a las 8 h (cercano a la ovulación), y a las 14 h (después de la ovulación), con la idea de detectar cambios en la expresión o en la función del receptor P2Y2 en el OSE durante el día de la ovulación. Trabajos recientes señalan la peculiar plasticidad de las células del OSE que rodean al ovario en respuesta a la influencia de estructuras intraováricas (Flesken-Nikitin et al., 2013; Ng et al., 2014), como los folículos ováricos y el cuerpo lúteo. La inmunodetección del receptor P2Y2 en el OSE adyacente a un folículo ovárico o adyacente a un cuerpo lúteo a las 8 h o a las 14 h, no mostró cambio en el nivel de expresión. De igual manera, no se observó diferencias significativas en el nivel de fosforilación de ERK dependiente a UTP en las horas de inyección durante

el día del estro. Estos resultados revelan que el receptor P2Y2 no parece estar regionalizado en función de las estructuras adyacentes y que el receptor está disponible a ser activado en el día del estro.

Para analizar si, de acuerdo a sus acciones en otros tejidos, la actividad de P2Y2 puede regular la inducción de proliferación en el OSE, nos dispusimos a realizar inyecciones intrabursales con el agonista no-hidrolizable, UTP $\gamma$ S [100 $\mu$ M] en uno de los ovarios, mientras que el ovario contralateral sería el control del experimento, la inducción de proliferación la evaluamos por el marcaje inmunohistoquímico de la proteína Ki67. Al activar el receptor P2Y2, el agonista UTP $\gamma$ S promueve la proliferación celular. La proliferación celular contribuye en el proceso de reparación y su ventana de acción durante la reparación postovulatoria comprende un periodo de 12 h a 72 h (Burdette et al., 2006; Tan & Fleming, 2004), en ovarios jóvenes (Mara et al., 2020). Nuestros resultados coinciden con la inducción de la fosforilación de ERK indicando así que vías proliferativas reguladas por P2Y2 son funcionales en inducir la proliferación al activar selectivamente al receptor en el momento indicado. Esta observación podría implicar que el ATP liberado en la lisis de las capas de células que forman el canal de expulsión del ovocito podrían rápidamente contribuir a activar los mecanismos de reparación de la superficie ovárica, induciendo la proliferación celular a través del receptor P2Y2.

El siguiente aspecto a analizar fueron los efectos a largo plazo (un ciclo estral = 4 días) de la activación o bloqueo del receptor P2Y2, en la población folicular. De manera interesante, el estímulo con UTP $\gamma$ S indujo incremento en la población y en el tamaño de folículos >250 y >400  $\mu$ m, caso contrario al bloquear el receptor con ARC-118925, donde se observó una disminución en el tamaño de folículo >250  $\mu$ m. Aunque la explicación del mecanismo involucrado en estas respuestas es compleja, proponemos que el receptor P2Y2 en el OSE, inicia una cascada de señalización que se amplifica y propaga en el ovario. En efecto, esta posibilidad podría sustentarse en la capacidad de las purinas extracelulares de modular las acciones gonadotrópicas (C.-J. Tai et al., 2001) o en la retroalimentación entre las integrinas y el receptor P2Y2 que permite transducir las señales a través de la lámina basal (Liao et al., 2007). Por otra parte, mecanismos de regulación similares en la dinámica folicular, han sido reportados al inyectar en la bursa

fosfato de esfingosina-1 (Pietro et al., 2017) o el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Abramovich et al., 2010).

El receptor P2Y2 podría ser un regulador de la proliferación celular que participa en la remodelación postovulatoria al ser activado por las propio ATP que se libera por lisis celular cuando se forma el canal de expulsión del ovocito. Además, podría estar regulando señales de crecimiento en los folículos que podría relacionarse con la selección y dominancia de folículos ovulatorios. Sin embargo, el papel en la fisiología ovárica continúa sin elucidarse.

## **CONCLUSIONES**

Los receptores P2Y2 se expresan en el epitelio superficial ovárico (OSE) en ratonas durante el día del estro y son funcionales dado que su estimulación farmacológica *in-situ* promueve la proliferación celular a través de un mecanismo dependiente de  $Ca^{2+}$ /ERK.

La activación del receptor P2Y2 sugiere una participación importante en el crecimiento de los folículos ováricos durante la ovulación.

Estos hallazgos contribuyen en la posible participación de la señalización purinérgica en el OSE durante la ovulación y en los procesos de reparación postovulatoria y abre nuevos enfoques en el papel de las purinas en la fisiología del ovario.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Abedini, A., Sayed, C., Carter, L. E., Boerboom, D., & Vanderhyden, B. C. (2020). Non-canonical WNT5a regulates Epithelial-to-Mesenchymal Transition in the mouse ovarian surface epithelium. *Scientific Reports*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66559-9>
- Abramovich, D., Irusta, G., Parborell, F., & Tesone, M. (2010). Intrabursal injection of vascular endothelial growth factor trap in eCG-treated prepubertal rats inhibits proliferation and increases apoptosis of follicular cells involving the PI3K/AKT signaling pathway. *Fertility and Sterility*, 93(5), 1369–1377. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.01.127>
- Aguado, L. I., & Ojeda, S. R. (1984). Prepubertal ovarian function is finely regulated by direct adrenergic influences. role of noradrenergic innervation. *Endocrinology*, 114(5), 1845–1853. <https://doi.org/10.1210/endo-114-5-1845>
- Ahmed, N., Thompson, E. W., & Quinn, M. A. (2007). Epithelial-Mesenchymal Interconversions in Normal Ovarian Surface Epithelium and Ovarian Carcinomas: An Exception to the Norm. *Journal Cellular Physiology*, 211(3)(May), 736–747. <https://doi.org/10.1002/JCP>
- Al-Rashida, M., & Iqbal, J. (2014). Therapeutic Potentials of Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase, Ecto-Nucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase, Ecto-5´-Nucleotidase, and Alkaline Phosphatase Inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, 34(4), 703–743. <https://doi.org/10.1002/med>
- Anderson, C. M., & Parkinson, F. E. (1997). Potential signalling roles for UTP and UDP: Sources, regulation and release of uracil nucleotides. *Trends in Pharmacological Sciences*, 18(10), 387–392. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(97\)01106-1](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(97)01106-1)
- Arellano, R. O., Martinez-Torres, A., & Garay, E. (2002). Ionic currents activated via purinergic receptors in the cumulus cell-enclosed mouse oocyte. *Biology of Reproduction*, 67(3), 837–846. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.003889>
- Atwood, C. S., & Vadakkadath Meethal, S. (2016). The spatiotemporal hormonal orchestration of human folliculogenesis, early embryogenesis and blastocyst

- implantation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 430, 33–48.  
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.03.039>
- Auersperg, N. (2011). The origin of ovarian carcinomas: A unifying hypothesis. *International Journal of Gynecological Pathology*, 30(1), 12–21.  
<https://doi.org/10.1097/PGP.0b013e3181f45f3e>
- Auersperg, N. (2013). Ovarian surface epithelium as a source of ovarian cancers: Unwarranted speculation or evidence-based hypothesis? *Gynecologic Oncology*, 130(1), 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.03.021>
- Auersperg, N., Maclaren, I. A., & Kruk, P. A. (1991). Ovarian surface epithelium: Autonomous production of connective tissue-type extracellular matrix. *Biology of Reproduction*, 44(4), 717–724. <https://doi.org/10.1095/biolreprod44.4.717>
- Auersperg, N., Wong, A. S. T., Choi, K. C., Kang, S. K., & Leung, P. C. K. (2001). Ovarian surface epithelium: Biology, endocrinology, and pathology. *Endocrine Reviews*, 22(2), 255–288. <https://doi.org/10.1210/er.22.2.255>
- Bahena-Alvarez, D., Rincón-Heredia, R., Millán-Aldaco, D., Fiordelasio, T., & Hernández-Cruz, A. (2019). Calcium signaling and expression of voltage-gated calcium channels in the mouse ovary throughout the estrous cycle†. *Biology of Reproduction*, 100(4), 1018–1034. <https://doi.org/10.1093/biolre/iyoy250>
- Bao, R., Xu, P., Wang, Y., Li, J., Zhang, J., Wang, J., Tang, M., & Zhang, C. (2017). P2Y6 purinergic receptor regulates steroid synthesis and proliferation of ovarian luteal cells. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 10(8), 11508–11518.
- Batra, Satish; Fadeel, I. (1994). Release of intracellular calcium and stimulation of cell growth by ATP and histamine in human ovarian cancer cells ( SKOV-3 ). *Cancer Letters*, 77(1), 57–63. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(94\)90348-4](https://doi.org/10.1016/0304-3835(94)90348-4)
- Berchuck, A., Rodriguez, G., Olt, G., Whitaker, R., Boente, M. P., Arrick, B. A., Clarke-Pearson, D. L., & Bast, R. C. J. (1992). Regulation of growth of normal ovarian epithelial cells and ovarian cancer cell lines by transforming growth factor-beta. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 166(2), 676–684.  
[https://doi.org/10.1016/0002-9378\(92\)91697-9](https://doi.org/10.1016/0002-9378(92)91697-9)
- Bjelobaba, I., Janjic, M. M., & Stojilkovic, S. S. (2015). Purinergic signaling pathways in endocrine system. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 191, 102–116.

<https://doi.org/10.1016/j.autneu.2015.04.010>

- Bodin, P., & Burnstock, G. (2001). *Purinergic Signalling: ATP Release* .pdf. 26(September), 959–969.
- Brunschweiler, A., & Müller, C. (2006). P2 Receptors Activated by Uracil Nucleotides - An Update. *Current Medicinal Chemistry*, 13(3), 289–312. <https://doi.org/10.2174/092986706775476052>
- Burdette, J. E., Kurley, S. J., Kilen, S. M., Mayo, K. E., & Woodruff, T. K. (2006). Gonadotropin-induced superovulation drives ovarian surface epithelia proliferation in CD1 mice. *Endocrinology*, 147(5), 2338–2345. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1629>
- Burnstock, G. (1972). Purinergic nerves. *Pharmacological Reviews*, 24(3), 509–581.
- Burnstock, G. (2014a). Purinergic signalling: From discovery to current developments. *Experimental Physiology*, 99(1), 16–34. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.071951>
- Burnstock, G. (2014b). Purinergic signalling in endocrine organs. *Purinergic Signalling*, 10(1), 189–231. <https://doi.org/10.1007/s11302-013-9396-x>
- Burnstock, G. (2014c). Purines and Purinoceptors: Molecular Biology Overview. In *Reference Module in Biomedical Sciences* (Issue September). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.04741-3>
- Burnstock, G. (2018). Purine and purinergic receptors. *Brain and Neuroscience Advances*, 2, 239821281881749. <https://doi.org/10.1177/2398212818817494>
- Butcher, R. L., Collins, W. E., & Fugo, N. W. (1974). Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology*, 94(6), 1704–1708. <https://doi.org/10.1210/endo-94-6-1704>
- Camici, M., Garcia-Gil, M., & Tozzi, M. G. (2018). The inside story of adenosine. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms19030784>
- Campos-Contreras, A. del R., Juárez-Mercado, A. P., González-Gallardo, A., Chávez-Genaro, R., Garay, E., De Ita-Pérez, D. L., Díaz-Muñoz, M., & Vázquez-Cuevas, F. G. (2019). Experimental polycystic ovarian syndrome is associated with reduced expression and function of P2Y2 receptors in rat theca cells. *Molecular Reproduction and Development*, 86(3), 308–318. <https://doi.org/10.1002/mrd.23106>

- Campos-Contreras, A. R., Díaz-Muñoz, M., & Vázquez-Cuevas, F. G. (2020). Purinergic Signaling in the Hallmarks of Cancer. *Cells*, 9(7), 1–24. <https://doi.org/10.3390/cells9071612>
- Carter, L. E., Cook, D. P., Collins, O., Gamwell, L. F., Dempster, H. A., Wong, H. W., McCloskey, C. W., Garson, K., Vuong, N. H., & Vanderhyden, B. C. (2019). COX2 is induced in the ovarian epithelium during ovulatory wound repair and promotes cell survival. *Biology of Reproduction*, 101(5), 961–974. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz134>
- Carter, L. E., Cook, D. P., McCloskey, C. W., Grondin, M. A., Landry, D. A., Dang, T., Collins, O., Gamwell, L. F., Dempster, H. A., & Vanderhyden, B. C. (2021). Transcriptional heterogeneity of stemness phenotypes in the ovarian epithelium. *Communications Biology*, 4(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02045-w>
- Chadet, S., Jelassi, B., Wannous, R., Angoulvant, D., Chevalier, S., Besson, P., & Roger, S. (2014). The activation of P2Y2 receptors increases MCF-7 breast cancer cells migration through the MEK-ERK1/2 signalling pathway. *Carcinogenesis*, 35(6), 1238–1247. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt493>
- Chambard, J. C., Lefloch, R., Pouysségur, J., & Lenormand, P. (2007). ERK implication in cell cycle regulation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1773(8), 1299–1310. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.11.010>
- 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. *Reproduction, Fertility and Development*, 19(8), 954–960. <https://doi.org/10.1071/RD07075>
- Choi, K.-C., Tai, C.-J., Tzeng, C.-R., Auersperg, N., & Leung, P. C. K. (2002). Follicle-Stimulating Hormone Activates Mitogen-Activated Protein Kinase in Preneoplastic and Neoplastic Ovarian Surface Epithelial Cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(5), 2245–2253. <https://doi.org/10.1210/jc.87.5.2245>
- Choi, J. H., Choi, K. C., Auersperg, N., & Leung, P. C. K. (2005). Gonadotropins upregulate the epidermal growth factor receptor through activation of mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol-3-kinase in human ovarian surface epithelial cells. *Endocrine-Related Cancer*, 12(2), 407–421.

<https://doi.org/10.1677/erc.1.00896>

- Choi, K.-C., Tai, C.-J., Tzeng, C.-R., Auersperg, N., & Leung, P. C. K. (2003). Adenosine Triphosphate Activates Mitogen-Activated Protein Kinase in Pre-Neoplastic and Neoplastic Ovarian Surface Epithelial Cells<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, *68*(1), 309–315. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.006551>
- Cora, M. C., Kooistra, L., & Travlos, G. (2015). Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicologic Pathology*, *43*(6), 776–793. <https://doi.org/10.1177/0192623315570339>
- Cordero, A. B., Kwon, Y., Hua, X., & Godwin, A. K. (2010). In vivo Imaging and Therapeutic Treatments in an Orthotopic Mouse Model of Ovarian Cancer. *Journal of Visualized Experiments*, *42*, 1–4. <https://doi.org/10.3791/2125>
- Corriden, R., & Insel, P. A. (2010). Basal release of ATP: An autocrine-paracrine mechanism for cell regulation. *Science Signaling*, *3*(104). <https://doi.org/10.1126/scisignal.3104re1>
- Costanzi, S., Mamedova, L., Gao, Z. G., & Jacobson, K. A. (2004). Architecture of P2Y nucleotide receptors: Structural comparison based on sequence analysis, mutagenesis, and homology modeling. *Journal of Medicinal Chemistry*, *47*(22), 5393–5404. <https://doi.org/10.1021/jm049914c>
- Daughaday, W. H. (1990). The possible autocrine/paracrine and endocrine roles of insulin-like growth factors of human tumors. *Endocrinology*, *127*(1), 1–4. <https://doi.org/10.1210/endo-127-1-1>
- Davies, B. R., Finnigan, D. S., Smith, S. K., & Ponder, B. A. J. (1999). Administration of gonadotropins stimulates proliferation of normal mouse ovarian surface epithelium. *Gynecological Endocrinology*, *13*(2), 75–81. <https://doi.org/10.3109/09513599909167536>
- De Ita, M., Vargas, M. H., Carbajal, V., Ortiz-Quintero, B., López-López, C., Miranda-Morales, M., Barajas-López, C., & Montaña, L. M. (2016). ATP releases ATP or other nucleotides from human peripheral blood leukocytes through purinergic P2 receptors. *Life Sciences*, *145*, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.12.013>
- Díaz-Muñoz, M., Campos-Contreras, A., Juárez-Mercado, P., Velázquez-Miranda, E., &

- G. Vázquez-Cuevas, F. (2019). Purinergic Signaling: A New Regulator of Ovarian Function. *Adenosine Triphosphate in Health and Disease*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80756>
- Drury, A. N., & Szent-Györgyi, A. (1929). The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *The Journal of Physiology*, *68*(3), 213–237. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1929.sp002608>
- Edmondson, R. J., Monaghan, J. M., & Davies, B. R. (2002). The human ovarian surface epithelium is an androgen responsive tissue. *British Journal of Cancer*, *86*(6), 879–885. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600154>
- Edson, M. A., Nagaraja, A. K., & Matzuk, M. M. (2009). The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine Reviews*, *30*(6), 624–712. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0012>
- Eppig, J. J., Ward-Bailey, P. F., & Coleman, D. L. (1985). Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. *Biology of Reproduction*, *33*(5), 1041–1049. <https://doi.org/https://doi.org/10.1095/biolreprod33.5.1041>
- Erickson, G. F., & Chang, R. J. (2007). Basic biology: Ovarian anatomy and physiology. In *Menopause* (Third Edit). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-012369443-0/50006-5>
- Flesken-Nikitin, A., Hwang, C. Il, Cheng, C. Y., Michurina, T. V., Enikolopov, G., & Nikitin, A. Y. (2013). Ovarian surface epithelium at the junction area contains a cancer-prone stem cell niche. *Nature*, *495*(7440), 241–245. <https://doi.org/10.1038/nature11979>
- Garrido, Maritza P.; Fernandois, Daniela; Venegas, Mauricio; Paredes H, A. (2018). Effects of Sympathectomy on Ovarian Follicular Development and Steroid Secretion. *Reproduction Research*, *155*, 171–179. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0318>
- Gava, N., Clarke, C. L., Bye, C., Byth, K., & de Fazio, A. (2008). Global gene expression profiles of ovarian surface epithelial cells in vivo. *Journal of Molecular Endocrinology*, *40*(5–6), 281–296. <https://doi.org/10.1677/JME-07-0149>
- Gaytán, M., Sánchez, M. A., Morales, C., Bellido, C., Millán, Y., Martín de las Mulas, J., Sánchez-Criado, J. E., & Gaytán, F. (2005). Cyclic changes of the ovarian surface epithelium in the rat. *Reproduction*, *129*(3), 311–321.

<https://doi.org/10.1530/rep.1.00401>

- Greenburg, G., & Hay, E. D. (1982). Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *Journal of Cell Biology*, *95*(1), 333–339. <https://doi.org/10.1083/jcb.95.1.333>
- Harden, T. K., & Lazarowski, E. R. (1999). Release of UTP from astrocytoma. *Progress in Brain Research*, *120*.
- Hillmann, P., Ko, G. Y., Spinrath, A., Raulf, A., Von Kügelgen, I., Wolff, S. C., Nicholas, R. A., Kostenis, E., Höltje, H. D., & Müller, C. E. (2009). Key determinants of nucleotide-activated G protein-coupled P2Y2receptor function revealed by chemical and pharmacological experiments, mutagenesis and homology modeling. *Journal of Medicinal Chemistry*, *52*(9), 2762–2775. <https://doi.org/10.1021/jm801442p>
- Hoffmann, G. E., Le, W. W., & Sita, L. V. (2008). The importance of titrating antibodies for immunocytochemical methods. *Current Protocols in Neuroscience*, *SUPPL. 45*, 1–26. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0212s45>
- Hornby, A. E., Pan, J., & Auersperg, N. (1992). Intermediate filaments in rat ovarian surface epithelial cells: changes with neoplastic progression in culture. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, *70*(1), 16–25. <https://doi.org/10.1139/o92-003>
- Irving-Rodgers, H. F., & Rodgers, R. J. (2006). Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. *Seminars in Reproductive Medicine*, *24*(4), 195–203. <https://doi.org/10.1055/s-2006-948549>
- Jacobson, K. A., Delicado, E. G., Gachet, C., Kennedy, C., von Kügelgen, I., Li, B., Miras-Portugal, M. T., Novak, I., Schöneberg, T., Perez-Sen, R., Thor, D., Wu, B., Yang, Z., & Müller, C. E. (2020). Update of P2Y receptor pharmacology: IUPHAR Review 27. *British Journal of Pharmacology*, *177*(11), 2413–2433. <https://doi.org/10.1111/bph.15005>
- Jacobson, K. A., Paoletta, S., Katritch, V., Wu, B., Gao, Z.-G., Zhao, Q., Stevens, R. C., & Kiselev, E. (2015). Nucleotides Acting at P2Y Receptors: Connecting Structure and Function. *Molecular Pharmacology*, *88*(2), 220–230. <https://doi.org/10.1124/mol.114.095711>
- Jin, H., Seo, J., Eun, S. Y., Joo, Y. N., Park, S. W., Lee, J. H., Chang, K. C., & Kim, H. J.

- (2014). P2Y2R activation by nucleotides promotes skin wound-healing process. *Experimental Dermatology*, 23(7), 480–485. <https://doi.org/10.1111/exd.12440>
- Jindal, S. K., Ishii, E., Letarte, M., Vera, S., Teerds, K. J., & Dorrington, J. H. (1995). Regulation of transforming growth factor  $\alpha$  gene expression in an ovarian surface epithelial cell line derived from a human carcinoma. *Biology of Reproduction*, 52(5), 1027–1037. <https://doi.org/10.1095/biolreprod52.5.1027>
- Juárez-Tapia, C. R., & Miranda-Anaya, M. (2016). El reloj circadiano ovárico: un segundero en la fisiología de la reproducción. *Enterciencias*, 4(10), 147–163.
- Karst, A. M., & Drapkin, R. (2010). Ovarian Cancer Pathogenesis: A Model in Evolution. *Journal of Oncology*, 2010, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2010/932371>
- King, B. F., Townsend-Nicholson, A., & Burnstock, G. (1998). Metabotropic receptors for ATP and UTP: Exploring the correspondence between native and recombinant nucleotide receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 19(12), 506–514. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.10.5344-5347.2005>
- Klepeis, V. E., Weinger, I., Kaczmarek, E., & Trinkaus-Randall, V. (2004). P2Y receptors play a critical role in epithelial cell communication and migration. *Journal of Cellular Biochemistry*, 93(6), 1115–1133. <https://doi.org/10.1002/jcb.20258>
- Kruk, P. A., Uitto, V. J., Firth, J. D., Dedhar, S., & Auersperg, N. (1994). Reciprocal interactions between human ovarian surface epithelial cells and adjacent extracellular matrix. In *Experimental Cell Research* (Vol. 215, Issue 1, pp. 97–108). <https://doi.org/10.1006/excr.1994.1320>
- Kulbe, H., Thompson, R., Wilson, J. L., Robinson, S., Hagemann, T., Fatah, R., Gould, D., Ayhan, A., & Balkwill, F. (2007). The inflammatory cytokine tumor necrosis factor- $\alpha$  generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Research*, 67(2), 585–592. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2941>
- Lara, H. E., & Belmar, J. (1991). Release of norepinephrine from the cat ovary: changes after ovulation. *Biology of Reproduction*, 44, 752–759. <https://doi.org/10.1095/biolreprod44.5.752>
- Lau, K. M., Mok, S. C., & Ho, S. M. (1999). Expression of human estrogen receptor- $\alpha$  and - $\beta$ , progesterone receptor, and androgen receptor mRNA in normal and malignant ovarian epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America*, 96(10), 5722–5727.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5722>
- Lazarowski, E., & Boucher, R. (2001). UTP as an extracellular signaling molecule. *News in Physiological Sciences*, 16(February), 1–5.  
<http://physiologyonline.physiology.org/content/16/1/1.short>
- Li, L., Shi, X., Shi, Y., & Wang, Z. (2021). The Signaling Pathways Involved in Ovarian Follicle Development. *Frontiers in Physiology*, 12(September), 1–9.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.730196>
- Li, W. H., Qiu, Y., Zhang, H. Q., Tian, X. X., & Fang, W. G. (2015). P2Y2 receptor and EGFR cooperate to promote prostate cancer cell invasion via ERK1/2 pathway. *PLoS ONE*, 10(7), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133165>
- Liao, Z., Seye, C. I., Weisman, G. A., & Erb, L. (2007). The P2Y2 nucleotide receptor requires interaction with  $\alpha$ v integrins to access and activate G12. *Journal of Cell Science*, 120(9), 1654–1662. <https://doi.org/10.1242/jcs.03441>
- Liu, W., Zhang, J., Gan, X., Shen, F., Yang, X., Du, N., Xia, D., Liu, L., Qiao, L., Pan, J., Sun, Y., & Xi, X. (2018). LGR5 promotes epithelial ovarian cancer proliferation, metastasis, and epithelial–mesenchymal transition through the Notch1 signaling pathway. *Cancer Medicine*, 7(7), 3132–3142. <https://doi.org/10.1002/cam4.1485>
- Luke, T. M., & Hexum, T. D. (2008). UTP and ATP increase extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in bovine chromaffin cells through epidermal growth factor receptor transactivation. *Purinergic Signalling*, 4(4), 323–330.  
<https://doi.org/10.1007/s11302-008-9098-y>
- Lustig, K. D., Shiau, A. K., Brake, A. J., & Julius, D. (1993). Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(11), 5113–5117.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.90.11.5113>
- Mara, J. N., Zhou, L. T., Larmore, M., Johnson, B., Ayiku, R., Amargant, F., Pritchard, M. T., & Duncan, F. E. (2020). Ovulation and ovarian wound healing are impaired with advanced reproductive age. *Aging*, 12(10), 9686–9713.  
<https://doi.org/10.18632/aging.103237>
- Martínez-Ramírez, A. S., & Vázquez-Cuevas, F. G. (2015). Purinergic signaling in the

- ovary. *Molecular Reproduction and Development*, 82(11), 839–848. <https://doi.org/10.1002/mrd.22537>
- McClellan, M., Kievit, P., Auersperg, N., & Rodland, K. (1999). Regulation of proliferation and apoptosis by epidermal growth factor and protein kinase C in human ovarian surface epithelial cells. *Experimental Cell Research*, 246(2), 471–479. <https://doi.org/10.1006/excr.1998.4328>
- McLean, A. C., Valenzuela, N., Fai, S., & Bennett, S. A. L. (2012). Performing Vaginal Lavage, Crystal Violet Staining, and Vaginal Cytological Evaluation for Mouse Estrous Cycle Staging Identification. *Journal of Visualized Experiments*, 67, 4–9. <https://doi.org/10.3791/4389>
- McNeil, L., Hobson, S., Nipper, V., & Rodland, K. D. (1998). Functional calcium-sensing receptor expression in ovarian surface epithelial cells. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 178(2), 305–313. [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(98\)80017-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(98)80017-3)
- Murdoch, W. J., & McDonnell, A. C. (2002). Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis. *Reproduction*, 123(6), 743–750. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1230743>
- Murdoch, W. J., Townsend, R. S., & McDonnell, a C. (2001). Ovulation-induced DNA damage in ovarian surface epithelial cells of ewes: prospective regulatory mechanisms of repair/survival and apoptosis. *Biology of Reproduction*, 65(5), 1417–1424. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.5.1417>
- Ng, A., & Barker, N. (2015). Ovary and fimbrial stem cells: Biology, niche and cancer origins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(10), 625–638. <https://doi.org/10.1038/nrm4056>
- Ng, A., Tan, S., Singh, G., Rizk, P., Swathi, Y., Tan, T. Z., Huang, R. Y. J., Leushacke, M., & Barker, N. (2014). Lgr5 marks stem/progenitor cells in ovary and tubal epithelia. *Nature Cell Biology*, 16(8), 745–757. <https://doi.org/10.1038/ncb3000>
- Okamura, H., & Katabuchi, H. (2004). Pathophysiological dynamics of human ovarian surface epithelial cells in epithelial ovarian carcinogenesis. *International Review of Cytology*, 242, 1–54. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)42001-4](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)42001-4)
- Okamura, H., Katabuchi, H., Nitta, M., & Ohtake, H. (2006). Structural changes and cell properties of human ovarian surface epithelium in ovarian pathophysiology.

*Microscopy Research and Technique*, 69(6), 469–481.  
<https://doi.org/10.1002/jemt.20306>

- Osterholzer, H. O., Streibel, E. J., & Nicosia, S. V. (1985). Growth effects of protein hormones on cultured rabbit ovarian surface epithelial cells. *Biology of Reproduction*, 33(1), 247–258. <https://doi.org/10.1095/biolreprod33.1.247>
- Padmanabhan, V., Puttabyatappa, M., & Cardoso, R. C. (2018). Hypothalamus-pituitary-ovary axis. *Encyclopedia of Reproduction*, 2, 121–129. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64632-9>
- Parr, C. E., Sullivan, D. M., Paradiso, A. M., Lazarowski, E. R., Burch, L. H., Olsen, J. C., Erb, L., Weisman, G. A., Boucher, R. C., & Turner, J. T. (1994). Cloning and expression of a human P(2U) nucleotide receptor, a target for cystic fibrosis pharmacotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(8), 3275–3279. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.8.3275>
- Parrott, J. A., Mosher, R., Grace, K. I. M., & Skinner, M. K. (2000). Autocrine interactions of keratinocyte growth factor, hepatocyte growth factor, and kit-ligand in the regulation of normal ovarian surface epithelial cells. *Endocrinology*, 141(7), 2532–2539. <https://doi.org/10.1210/endo.141.7.7581>
- Pierro, E., Nicosia, S. V., Saunders, B., Fultz, C. B., Nicosia, R. F., & Mancuso, S. (1996). Influence of growth factors on proliferation and morphogenesis of rabbit ovarian mesothelial cells in vitro. *Biology of Reproduction*, 54(3), 660–669. <https://doi.org/10.1095/biolreprod54.3.660>
- Pietro, M. Di, Pascuali, N., Scotti, L., Irusta, G., Bas, D., May, M., Tesone, M., Abramovich, D., & Parborell, F. (2017). In vivo intrabursal administration of bioactive lipid sphingosine- 1-phosphate enhances vascular integrity in a rat model of ovarian hyperstimulation syndrome. *Molecular Human Reproduction*, 23(6), 417–427. <https://doi.org/10.1093/molehr/gax021>
- Polan, M. L., Decherney, A. H., Haseltine, F. P., Mezer, H. C., & Behrman, H. R. (1983). Adenosine Amplifies Follicle-Stimulating Hormone Action in Granulosa Cells and Luteinizing Hormone Action in Luteal Cells of Rat and Human Ovaries. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 56(2), 288–294. <https://doi.org/10.1210/jcem-56-2-288>

- Popper, L. D., & Batra, S. (1993). Calcium mobilization and cell proliferation activated by extracellular ATP in human ovarian tumour cells. *Cell Calcium*, *14*(3), 209–218. [https://doi.org/10.1016/0143-4160\(93\)90068-H](https://doi.org/10.1016/0143-4160(93)90068-H)
- Rafehi, M., Burbiel, J. C., Attah, I. Y., Abdelrahman, A., & Müller, C. E. (2017). Synthesis, characterization, and in vitro evaluation of the selective P2Y2 receptor antagonist AR-C118925. *Purinergic Signalling*, *13*(1), 89–103. <https://doi.org/10.1007/s11302-016-9542-3>
- Rafehi, M., & Müller, C. E. (2018). Tools and drugs for uracil nucleotide-activated P2Y receptors. *Pharmacology and Therapeutics*, *190*, 24–80. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.04.002>
- Rajkovic, A., Pangas, S. A., & Matzuk, M. M. (2006). *Chapter 10 Follicular Development; Mouse, Sheep and Human Models*. 3.
- Reyna-Jeldes, M., De la Fuente-Ortega, E., Cerda, D., Velázquez-Miranda, E., Pinto, K., Vázquez-Cuevas, F. G., & Coddou, C. (2021). Purinergic p2y2 and p2x4 receptors are involved in the epithelial-mesenchymal transition and metastatic potential of gastric cancer derived cell lines. *Pharmaceutics*, *13*(8). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081234>
- Richards, J. S., Pangas, S. A., Richards, J. S., & Pangas, S. A. (2010). *The ovary : basic biology and clinical implications Find the latest version : Review series The ovary : basic biology and clinical implications*. *120*(4), 963–972. <https://doi.org/10.1172/JCI41350.critical>
- Rodriguez, G. C., Berchuck, A., Whitaker, R. S., Schlossman, D., Clarke-Pearson, D. L., & Bast, R. C. (1991). Epidermal growth factor receptor expression in normal ovarian epithelium and ovarian cancer: II. Relationship between receptor expression and response to epidermal growth factor. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *164*(3), 745–750. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(91\)90508-O](https://doi.org/10.1016/0002-9378(91)90508-O)
- Russell, D. L., & Robker, R. L. (2007). Molecular mechanisms of ovulation: Co-ordination through the cumulus complex. *Human Reproduction Update*, *13*(3), 289–312. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml062>
- Ryan, P. L., Valentine, A. F., & Bagnell, C. A. (1996). Expression of epithelial cadherin in the developing and adult pig ovary. *Biology of Reproduction*, *55*(5), 1091–1097.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod55.5.1091>

- Schultze-Mosgau, A., Katzur, A. C., Arora, K. K., Stojilkovic, S. S., Diedrich, K., & Ortman, O. (2000). Characterization of calcium-mobilizing, purinergic P2Y2 receptors in human ovarian cancer cells. *Molecular Human Reproduction*, 6(5), 435–442. <https://doi.org/10.1093/molehr/6.5.435>
- Schwiebert, E. M., & Zsembery, A. (2003). Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1615(1–2), 7–32. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00210-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00210-4)
- Siemens, C. H., & Auersperg, N. (1988). Serial propagation of human ovarian surface epithelium in tissue culture. *Journal of Cellular Physiology*, 134(3), 347–356. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041340305>
- Singavarapu, R., Buchinsky, N., Cheon, D., & Orsulic, S. (2010). *Singavarapu 2013 Whole ovary immunohistochemistry for.pdf*. 1–7.
- Spicer, L. J. (1986). Catecholaminergic Regulation of Ovarian Function in Mammals: Current Concepts. *Life Sciences*, 39(c), 1701–1711.
- Strauss, J. F., & Williams, C. J. (2018). Ovarian Life Cycle. In *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management: Eighth Edition* (Seventh Ed). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47912-7.00008-1>
- Szotek, P. P., Chang, H. L., Brennand, K., Fujino, A., Pieretti-Vanmarcke, R., Lo Celso, C., Dombkowski, D., Preffer, F., Cohen, K. S., Teixeira, J., & Donahoe, P. K. (2008). Normal ovarian surface epithelial label-retaining cells exhibit stem/progenitor cell characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 105(34), 12469–12473. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805012105>
- Tackett, B. C., Sun, H., Mei, Y., Maynard, J. P., Cheruvu, S., Mani, A., Hernandez-Garcia, A., Vigneswaran, N., Karpen, S. J., & Thevananther, S. (2014). P2Y2 purinergic receptor activation is essential for efficient hepatocyte proliferation in response to partial hepatectomy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 307(11), G1073-87. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00092.2014>
- Tai, C.-J., Kang, S. K., & Leung, P. C. K. (2001). Adenosine Triphosphate-Evoked Cytosolic Calcium Oscillations in Human Granulosa-Luteal Cells: Role of Protein Kinase C1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(2), 773–777.

<https://doi.org/10.1210/jcem.86.2.7231>

- Tai, C. J., Kang, S. K., Choi, K. C., Tzeng, C. R., & Leung, P. C. K. (2001). Antigonadotropic action of adenosine triphosphate in human granulosa-luteal cells: Involvement of protein kinase C alpha. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *86*(7), 3237–3242. <https://doi.org/10.1210/jc.86.7.3237>
- Tai, C. J., Kang, S. K., & Leung, P. C. K. (2001). Adenosine triphosphate-evoked cytosolic calcium oscillations in human granulosa-luteal cells: Role of protein kinase C. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *86*(2), 773–777. <https://doi.org/10.1210/jc.86.2.773>
- Tan, O. L., & Fleming, J. S. (2004). Proliferating Cell Nuclear Antigen Immunoreactivity in the Ovarian Surface Epithelium of Mice of Varying Ages and Total Lifetime Ovulation Number Following Ovulation<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, *71*(5), 1501–1507. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.030460>
- Usongo, M., & Farookhi, R. (2012).  $\beta$ -catenin/Tcf-signaling appears to establish the murine ovarian surface epithelium (OSE) and remains active in selected postnatal OSE cells. *BMC Developmental Biology*, *12*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-12-17>
- van Niekerk, C. C., Boerman, O. C., Ramaekers, F. C., & Poels, L. G. (1991). Marker profile of different phases in the transition of normal human ovarian epithelium to ovarian carcinomas. *The American Journal of Pathology*, *138*(2), 455–463. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1886195&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Vázquez-Cuevas, F. G., Cruz-Rico, A., Garay, E., García-Carrancá, A., Pérez-Montiel, D., Juárez, B., & Arellano, R. O. (2013). Differential expression of the P2X7 receptor in ovarian surface epithelium during the oestrous cycle in the mouse. *Reproduction, Fertility and Development*, *25*(7), 971–984. <https://doi.org/10.1071/RD12196>
- Vázquez-Cuevas, F. G., Cruz-Rico, A., Garay, E., Pérez-Montiel, D., Juárez, B., & Arellano, R. O. (2013). Differential expression of the P2X7 receptor in ovarian surface epithelium during the oestrous cycle in the mouse. *Reproduction, Fertility and Development*, *1*, 971–984. <https://doi.org/10.1071/RD12196>
- Vázquez-Cuevas, F. G., Juárez, B., Garay, E., & Arellano, R. O. (2006). ATP-Induced

- Apoptotic Cell Death in Porcine Ovarian Theca Cells Through P2X7 Receptor Activation. *Molecular Reproduction and Development*, 73, 745–755. <https://doi.org/10.1002/mrd>
- Vázquez-Cuevas, F. G., Zárate-Díaz, E. P., Garay, E., & Arellano, R. O. (2010). Functional expression and intracellular signaling of UTP-sensitive P2Y receptors in theca-interstitial cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-88>
- Velázquez-Miranda, E., Molina-Aguilar, C., González-Gallardo, A., Vázquez-Martínez, O., Díaz-Muñoz, M., & Vázquez-Cuevas, F. G. (2020). Increased purinergic responses dependent on p2y2 receptors in hepatocytes from ccl4-treated fibrotic mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7). <https://doi.org/10.3390/ijms21072305>
- von Kügelgen, I. (2006). Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacology and Therapeutics*, 110(3), 415–432. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.08.014>
- von Kügelgen, I., & Harden, T. K. (2011). Molecular pharmacology, physiology, and structure of the P2Y receptors. *Advances in Pharmacology*, 61, 373–415. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385526-8.00012-6>
- Wang, J., Liu, C., He, L., Xie, Z., Bai, L., Yu, W., Wang, Z., Lu, Y., Gao, D., Fu, J., Zhang, L., Zeng, Y. A., Abedini, A., Sayed, C., Carter, L. E., Boerboom, D., Vanderhyden, B. C., Landry, D. A., Vaishnav, H. T., ... Vanderhyden, B. C. (2020). Selective YAP activation in Procr cells is essential for ovarian stem/progenitor expansion and epithelium repair. *Oncotarget*, 11(5), 4366–4370. <https://doi.org/10.7554/eLife.75449>
- Wang, J., Liu, S., Nie, Y., Wu, B., Wu, Q., Song, M., Tang, M., Xiao, L., Xu, P., Tan, X., Zhang, L., Li, G., Liang, S., & Zhang, C. (2015). Activation of P2X7receptors decreases the proliferation of murine luteal cells. *Reproduction, Fertility and Development*, 27(8), 1262–1271. <https://doi.org/10.1071/RD14381>
- Wang, J., Wang, D., Chu, K., Li, W., & Zeng, Y. A. (2019). Procr-expressing progenitor cells are responsible for murine ovulatory rupture repair of ovarian surface epithelium. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12935-7>
- Wang, Z. Y., Gaggero, A., Rubartelli, A., Rosso, O., Miotti, S., Mezzanzanica, D.,

- Canevari, S., & Ferrini, S. (2002). Expression of interleukin-18 in human ovarian carcinoma and normal ovarian epithelium: Evidence for defective processing in tumor cells. *International Journal of Cancer*, *98*(6), 873–878. <https://doi.org/10.1002/ijc.10268>
- Wong, A. S. T., & Leung, P. C. K. (2007). Role of endocrine and growth factors on the ovarian surface epithelium. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, *33*(1), 3–16. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0756.2007.00478.x>
- Wong, A. S. T., Maines-Bandiera, S. L., Rosen, B., Wheelock, M. J., Johnson, K. R., Leung, P. C. K., Roskelley, C. D., & Auersperg, N. (1999). Constitutive and conditional cadherin expression in cultured human ovarian surface epithelium: Influence of family history of ovarian cancer. *International Journal of Cancer*, *81*(2), 180–188. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19990412\)81:2<180::AID-IJC3>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19990412)81:2<180::AID-IJC3>3.0.CO;2-7)
- Wong, A. S. T., Roskelley, C. D., Pelech, S., Miller, D., Leung, P. C. K., & Auersperg, N. (2004). Progressive changes in Met-dependent signaling in a human ovarian surface epithelial model of malignant transformation. *Experimental Cell Research*, *299*(1), 248–256. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.06.002>
- Wright, J. W., Pejovic, T., Jurevic, L., Bishop, C. V., Hobbs, T., & Stouffer, R. L. (2011). Ovarian surface epitheliectomy in the non-human primate: Continued cyclic ovarian function and limited epithelial replacement. *Human Reproduction*, *26*(6), 1422–1430. <https://doi.org/10.1093/humrep/der061>
- Wright, J. W., Pejovic, T., Lawson, M., Jurevic, L., Hobbs, T., & Stouffer, R. L. (2010). Ovulation in the Absence of the Ovarian Surface Epithelium in the Primate<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, *82*(3), 599–605. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.081570>
- Wu, S., Boyer, C. M., Whitaker, R. S., Berchuck, A., Wiener, J. R., Weinberg, J. B., & Bast, R. C. J. (1993). Tumor necrosis factor alpha as an autocrine and paracrine growth factor for ovarian cancer: monokine induction of tumor cell proliferation and tumor necrosis factor alpha expression. *Cancer Research*, *53*(8), 1939–1944.
- Xu, J., Zheng, T., Hong, W., Ye, H., Hu, C., & Zheng, Y. (2018). Mechanism for the Decision of Ovarian Surface Epithelial Stem Cells to Undergo Neo-Oogenesis or Ovarian Tumorigenesis. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal*

*of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 50(1), 214–232. <https://doi.org/10.1159/000494001>

Yi, B. R., Kim, T. H., Kim, Y. S., & Choi, K. C. (2015). Alteration of epithelial-mesenchymal transition markers in human normal ovaries and neoplastic ovarian cancers. *International Journal of Oncology*, 46(1), 272–280. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2695>

Zemskov, E., Lucas, R., Verin, A. D., & Umapathy, N. S. (2011). P2Y receptors as regulators of lung endothelial barrier integrity. *Journal of Cardiovascular Disease Research*, 2(1), 14–22. <https://doi.org/10.4103/0975-3583.78582>

Zhang, S., Zhang, H. S., Cordon-Cardo, C., Ragupathi, G., & Livingston, P. O. (1998). Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: Protein antigens. *Clinical Cancer Research*, 4(11), 2669–2676.

Zhu, Y., Maric, J., Nilsson, M., Brännström, M., Janson, P.-O., & Sundfeldt, K. (2004). Formation and barrier function of tight junctions in human ovarian surface epithelium. *Biology of Reproduction*, 71(1), 53–59. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.022913>

Zhu, Y., Nilsson, M., & Sundfeldt, K. (2010). Phenotypic plasticity of the ovarian surface epithelium: TGF- $\beta$ 1 induction of Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) in vitro. *Endocrinology*, 151(11), 5497–5505. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0486>

Ziltener, H., Maines-Bandiera, S., Schrader, J., & Auersperg, N. (1993). Secretion of bioactive interleukin-1, interleukin-6, and colony-stimulating factors by human ovarian surface epithelium. *Biology of Reproduction*, 49(3), 635–641. <https://doi.org/10.1095/biolreprod49.3.635>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**exCa<sup>2+</sup>**: calcio extracelular

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>**: Concentración de calcio intracelular

**ADA**: Adenosina deaminasa

**ADP**: Adenosina difosfato

**AKT**: Proteína cinasa B

**ALP**: Fosfatasas alcalinas

**AMP**: Adenosina monofosfato

**APu**: Activador del plasminógeno urocinasa

**ARC-118925**: Carboxamida-2-furan(2H-tetrazol-5-il)-N-[metil[5-(6,13-dimetil-2-triciclo[9.4.0.0<sup>3,8</sup>]pentadeca-1(11),3(8),4,6,9,12,14-heptaenil)-2-oxo-4-sulfailidenepirimidin-1-il]

**ATP**: Adenosina trifosfato

**AUF**: Unidades arbitrarias de fluorescencia

**BzATP**: 2'(3')-O-(4-Benzoilbenzoil) adenosina-5'-trifosfato

**Ca<sup>2+</sup>**: ión calcio

**cDNA**: Ácido desoxirribonucleico complementario

**CL**: Cuerpo lúteo

**COX2**: Cicloxigenasa 2

**CQ-18**: Citoqueratina 18

**DAPI**: 4', 6-diamino-2-fenilindol

**DNAsa**: Desoxirribonucleasa

**dNTPs**: 2'-desoxinucleósido'trifosfatos

**E2**: Estradiol

**EGF**: Factor de crecimiento epidermal

**ENPP**: Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa

**ENTPD**: Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa

**ERK**: Cinasa regulada por señales extracelulares

**FO**: Folículo ovárico

**FSH**: Hormona folículo estimulante

**GMP:** Guanosina monofosfato  
**GnRH:** Hormona liberadora de gonadotropinas  
**HGF:** Factor de crecimiento hepático  
**IGF:** Factor de crecimiento similar a la insulina  
**IL:** Interleucina  
**IP3:** Inositol trifosfato 3  
**KRS:** Solución de Krebs-Ringer  
**Lgr5:** Receptor 5 acoplado a proteína G con repeticiones de leucina  
**LH:** Hormona luteinizante  
**MAPK:** Proteínas cinasas activadas por mitógenos  
**M-MLV:** Transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney  
**MMP:** Metaloproteasa  
**MUC1:** Mucina 1  
**NT5E:** Ecto-5'-nucleotidasa  
**OSE:** Epitelio superficial ovárico  
**P1:** Receptores sensibles a Adenosina  
**P2:** Receptores sensibles a ATP  
**P2X:** Receptor purinérgico canal iónico activado por ligando  
**P2Y:** Receptor purinérgico acoplado a proteínas G  
**P4:** Progesterona  
**PBS:** Solución amortiguadora de fosfatos  
**pERK:** ERK fosforilado  
**PFA:** Paraformaldehído  
**Pi:** Fosfato inorgánico  
**PI:** Yoduro de propidio  
**PKC:** Proteína cinasa C  
**PLC:** Fosfolipasa C  
**PPi:** Pirofosfato inorgánico  
**Procr:** Receptor de Proteína C  
**PTGER4:** Receptor de Prostaglandina E subtipo 4  
**RNA:** Ácido ribonucleico

**RT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa con reverso transcripción

**SNC:** Sistema Nervioso Central

**SOD2:** Superóxido dismutasa 2

**TEM:** Transición epitelio mesénquima

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante beta

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa

**UTP:** Uridina trifosfato

**UTPyS:** Uridina-5'-( $\gamma$ -tio)-trifosfato

**VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

**Figura 1.-** Estructura del Ovario.

**Figura 2.-** Monitoreo de los niveles hormonales durante el ciclo estral de los roedores.

**Figura 3.-** Mecanismo de ruptura del OSE durante la ovulación.

**Figura 4.-** Fases cíclicas de ruptura, ovulación y reparación del OSE.

**Figura 5.-** El sistema purinérgico en la comunicación paracrina-autocrina.

**Figura 6.-** Expresión de los receptores purinérgicos en las células ováricas.

**Figura 7.-** Cambios en la concentración de calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) inducidos por ligandos purinérgicos en cultivos primarios de OSE.

**Figura 8.-** El marcador epitelial citoqueratina 18 (CQ-18) se expresa en el OSE de ratón.

**Figura 9.-** El receptor P2Y2 se expresa en el OSE de ratón *in-vitro*.

**Figura 10.-** El receptor P2Y2 se expresa en el OSE de ratón *in-situ*.

**Figura 11.-** La expresión del receptor P2Y2 en el OSE adyacente a folículos o cuerpos lúteos, es similar a las 8 y 14h del día del estro

**Figura 12.-** La estimulación *in-vitro* e *in-situ* de las rebanadas de ovario con ATP o UTP induce el incremento del  $[Ca^{2+}]_i$  en el OSE.

**Figura 13.-** La administración intrabursal de UTP induce la fosforilación de ERK en las células del OSE.

**Figura 14.-** El UTP genera un incremento de la señal de ERK fosforilado en las células del OSE adyacente a folículos ováricos.

**Figura 15.-** El UTP genera un incremento de la señal de ERK fosforilado en las células del OSE adyacente a cuerpos lúteos.

**Figura 16.-** La estimulación farmacológica del receptor P2Y2 induce la proliferación celular a corto plazo en el OSE.

**Figura 17.-** La estimulación farmacológica del receptor P2Y2 genera cambios en la población folicular durante un ciclo estral.

**Figura 18.** La estimulación farmacológica del receptor P2Y2 altera la distribución de la población folicular durante un ciclo estral.

## **ÍNDICE DE TABLAS**

**Tabla 1.-** Características generales y moleculares del epitelio superficial ovárico (OSE).

**Tabla 2.-** Receptores P2Y y su sensibilidad a agonistas y antagonistas.

## **ARTÍCULOS PUBLICADOS**

Functional expression of P2Y2 receptors in mouse ovarian surface epithelium (OSE).

**Juárez-Mercado AP**, Chávez-Genaro R, Fiordeliso T, González-Gallardo A, Díaz-Muñoz M, Vázquez-Cuevas FG. Mol Reprod Dev. 2021 Nov;88(11):758-770. doi: 10.1002/mrd.23545. Epub 2021 Oct 25. PMID:34694051