



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

EXPRESIÓN FUNCIONAL DEL RECEPTOR PURINÉRGICO P2X7 Y LA
INDUCCIÓN DE LA APOPTOSIS EN EL EPITELIO SUPERFICIAL OVÁRICO
DE RATÓN

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA

Biól. ALEJANDRA CRUZ RICO

TUTORES

Dr. FRANCISCO GABRIEL VÁZQUEZ CUEVAS

Dr. ROGELIO ARELLANO OSTOA

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. GONZALO MARTÍNEZ DE LA ESCALERA LORENZO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Dra. GUADALUPE GARCÍA ALCOGER

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, UAQ

Dra. MARICELA LUNA MUÑOZ

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Dr. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

QUERÉTARO, QRO. DICIEMBRE, 2012.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: Alejandra Cruz Rico, cuyo título es: “Expresión funcional del receptor purinérgico P2X7 y la inducción de la apoptosis en el epitelio superficial ovárico de ratón” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo

Secretario (Tutor)

Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas

Vocal

Dra. Guadalupe García Alcocer

Suplente

Dra. Maricela Luna Muñoz

Suplente

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Aprobado por el Comité Académico

Dra. María Teresa Morales Guzmán

Coordinadora del Programa de la Maestría en Ciencias (Neurobiología)

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurofisiología Celular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas y el Dr. Rogelio Arellano Ostoa, y fue apoyado con recursos financieros de CONACyT-México (No. 82340 para ROA y No. 166725 para FV-C), PAPIIT-UNAM (No. IN214409 y No. IN205312 para ROA y No. IN208209 para FV-C) y IACOD-UNAM (No. IA200112 para FV-C).

RESUMEN

El epitelio superficial ovárico (OSE) es una monocapa de células que rodea al ovario; participa durante la ovulación y es también importante en la carcinogénesis ovárica. En el laboratorio hemos mostrado la expresión funcional de un sistema de señalización purinérgica en las células somáticas y germinales del ovario; esto sugiere que el ATP es un modulador fisiológico intraovárico que ejerce sus acciones a través de receptores P2Y y P2X. Los receptores P2X forman canales catiónicos activados por ligando, son conocidos siete diferentes subtipos de estas moléculas. Se ha documentado que la activación de P2X7 promueve la liberación de citocinas pro-inflamatorias e induce apoptosis, procesos fundamentales para la ovulación. Evidencias previas sugerían que el receptor P2X7 se expresaba de manera específica en el OSE de ratón. Aquí confirmamos que P2X7 es expresado en el OSE de ratón utilizando ensayos de inmunofluorescencia. Mostramos además que a lo largo del ciclo estral, el nivel de expresión, evaluado por la intensidad de fluorescencia, fue mayor en el OSE adyacente a los folículos antrales durante la etapa del proestro. La activación específica de P2X7 aplicando el agonista BzATP *in vivo*, provocó la apoptosis del OSE que fue analizada utilizando la técnica de TUNEL. Este efecto fue de mayor intensidad durante el diestro y el proestro, y fue bloqueado por A438079, antagonista específico de P2X7. La expresión del receptor P2X7 en el OSE y su habilidad para inducir apoptosis sugiere su participación en el proceso de ovulación.

Palabras clave: Apoptosis, receptor P2X7, epitelio superficial ovárico.

SUMMARY

The ovarian surface epithelium (OSE) is a monolayer of cells that surrounds the ovary; it is involved in ovulation and is also important in ovarian carcinogenesis. Our group had shown the functional expression of a purinergic signaling system in the somatic and germ cells of the ovary, suggesting that ATP is an intraovarian physiological modulator. ATP exerts its actions through P2X and P2Y receptors. P2X receptors are ligand-gated cation channels; seven different subunits are known, that combine to form functional trimeric channels. It has been documented that the activation of P2X7 promotes the release of pro-inflammatory cytokines and induces apoptosis, processes that are essential for ovulation. Previous evidence suggests that the P2X7 receptor is specifically expressed in the mouse OSE. Here, using immunofluorescence assays, we confirmed that P2X7 is expressed in this ovarian structure in the mouse. We used fluorescence intensity to show that during proestrus phase of the estrous cycle, the P2X7 expression level was greater in the OSE adjacent to the antral follicles. The specific, in vivo activation of P2X7 by the agonist BzATP caused apoptosis in the OSE, as detected by the TUNEL technique. This effect was most intense during diestrus and proestrus day, and was blocked by A438079, a specific antagonist of P2X7. P2X7 receptor expression in the OSE close to antral follicles and its ability to induce apoptosis suggest a possible role in the ovulatory process.

Key words: Apoptosis, P2X7 receptor, ovarian surface epithelium.

DEDICATORIAS

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (becaria No. 289595), así como a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (cuenta No. 511006612) por el apoyo económico otorgado durante la realización de este proyecto.

Al Instituto de Neurobiología de la UNAM por la oportunidad de formarme como Maestra en Ciencias (Neurobiología).

Agradezco a mis tutores el Dr. Francisco Vázquez Cuevas y el Dr. Rogelio Arellano Ostoia por su apoyo para la realización del presente trabajo de investigación y por permitirme formar parte del laboratorio D-13 del Instituto de Neurobiología, UNAM.

Al comité tutor formado por la Dra. Maricela Luna Muñoz y la Dra. Stéphanie Thebault por sus atinadas observaciones en cada tutorial y las correcciones al escrito.

De manera especial a la Dra. Edith Garay Rojas por todo el apoyo en la realización del proyecto y sus atinados comentarios.

A los miembros del Jurado de examen de grado integrado por el Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo, la Dra. Guadalupe García Alcocer, la Dra. Maricela Luna Muñoz y el Dr. Mauricio Díaz Muñoz, por servirse a leer este escrito.

Al Sr. Horacio Ramírez Leyva auxiliar del laboratorio por su apoyo técnico. A la Ing. Nydia Hernández Ríos por su apoyo en la adquisición de las imágenes de microscopía confocal, a la M. en C. Lorena López Sánchez por su apoyo con el procesamiento de las muestras de tejido, al M.V.Z. Martín García Servín encargado del Bioterio del Instituto de Neurobiología. A la M. en C. Leonor Casanova Rico por el apoyo con los trámites administrativos a lo largo de la maestría. Al Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela responsable de la biblioteca de la UNAM campus Juriquilla. A la Dra. Dorothy Pless por la revisión del resumen en inglés. A todos mis compañeros del laboratorio D-13 por el apoyo técnico y moral.

ÍNDICE

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Foliculogénesis.....	1
1.2 El epitelio superficial ovárico (OSE) de mamífero.....	1
1.3 Ciclo estral.....	5
1.4 Función del OSE en la ovulación.....	7
1.5 Aspectos fisiopatológicos del OSE.....	12
1.6 El ATP como transmisor intercelular.....	13
1.7 Sistema purinérgico.....	15
1.8 El receptor P2X7.....	18
1.9 Apoptosis en el ovario.....	21
1.10 El sistema purinérgico en el ovario.....	23
2. ANTECEDENTES	26
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. HIPÓTESIS	28
5. OBJETIVOS	29
5.1 Objetivo General.....	29
5.2 Objetivos Particulares.....	29
6. MATERIAL Y MÉTODOS	30
6.1 Animales y registro del ciclo estral.....	30
6.2 Reactivos.....	30
6.3 Obtención de las rebanadas de ovario.....	31
6.4 Histología del ovario de ratón.....	32
6.5 Inmunofluorescencia.....	32
6.6 Microinyección en el espacio intrabursal del agonista y del antagonista del receptor P2X7.....	34

6.7 Detección de la fragmentación del ADN: TUNEL.....	34
6.8 Análisis estadísticos.....	35
7. RESULTADOS.....	37
7.1 Registro del ciclo estral en ratón.....	37
7.2 Análisis histológico del ovario de ratón.....	38
7.3 Expresión de los marcadores de epitelio en el OSE de ratón.....	40
7.4 Expresión del receptor purinérgico P2X7 en el epitelio superficial ovárico de ratón a través del ciclo estral.....	43
7.5 Co-localización del receptor purinérgico P2X7 y la citoqueratina en el epitelio superficial ovárico de ratón.....	51
7.6 Inducción <i>in vivo</i> de la apoptosis en el OSE a través del ciclo estral por la activación del receptor P2X7.....	53
8. DISCUSIÓN.....	62
8.1 ATP como mensajero extracelular en el ovario.....	62
8.2 Expresión del sistema purinérgico en el ovario.....	63
8.3 Expresión del receptor P2X7 en el OSE de ratón a través del ciclo estral.....	63
8.4 Inducción de la apoptosis en el OSE mediante la activación del receptor P2X7 en las distintas fases del ciclo estral.....	65
8.5 P2X7 y su relación con el proceso de ovulación.....	66
9. CONCLUSIONES.....	68
10. REFERENCIAS.....	69
ÍNDICE DE FIGURAS.....	84
LISTA DE ABREVIATURAS.....	86

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Foliculogénesis

La foliculogénesis en mamíferos incluye: 1) la diferenciación de las células germinales primitivas derivadas del epiblasto extraembrionario, 2) el reclutamiento de los folículos primordiales, 3) la diferenciación y proliferación de las células de la granulosa y células de la teca que rodean completamente a cada ovocito, 4) un continuo crecimiento folicular junto con la maduración meiótica, 5) la selección del folículo y, 6) la ovulación (Baird & Mitchell, 2002; Vanderhyden, 2002).

El crecimiento folicular involucra a las células de la teca y a las células de la granulosa. Se pueden distinguir dos etapas en el mismo: la temprana, que es independiente de las gonadotropinas, y la antral, dependiente de la acción combinada de las gonadotropinas (hormona luteinizante, LH y folículo estimulante, FSH) y de los esteroides ováricos. El pico preovulatorio de la LH induce la maduración meiótica y la expansión del cumulus, requisitos para la extrusión del complejo formado por el ovocito y las células del cumulus. Una vez llevada a cabo la ovulación, las células de la granulosa y las células de la teca se transdiferencian hacia un fenotipo luteal (Baird & Mitchell, 2002; Velázquez & Mendieta, 2005).

1.2 El epitelio superficial ovárico de mamífero

En mamíferos la superficie ovárica se encuentra cubierta por un epitelio simple cúbico, el epitelio superficial ovárico llamado OSE por sus siglas en inglés (*Ovarian Surface Epithelium*) (**fig. 1**). Durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario, el epitelio celómico derivado del mesodermo que recubre a la futura gónada dará origen al OSE. Luego del quinto mes de vida prenatal en humano, éste se estratifica, y en la etapa postnatal es reemplazado por un epitelio simple y cúbico que se conserva en el individuo adulto. El OSE se dispone en un sólo estrato que descansa sobre una lámina basal que lo separa de la túnica albugínea subyacente (**fig. 2**). La túnica albugínea está compuesta por una densa capa de

tejido conectivo y fibroblastos que separan al OSE del estroma ovárico (Auersperg et al., 2001; Chuaire-Noack et al., 2008) y de la circulación, esto limita el acceso de factores sistémicos (Auersperg & Woo, 2004).

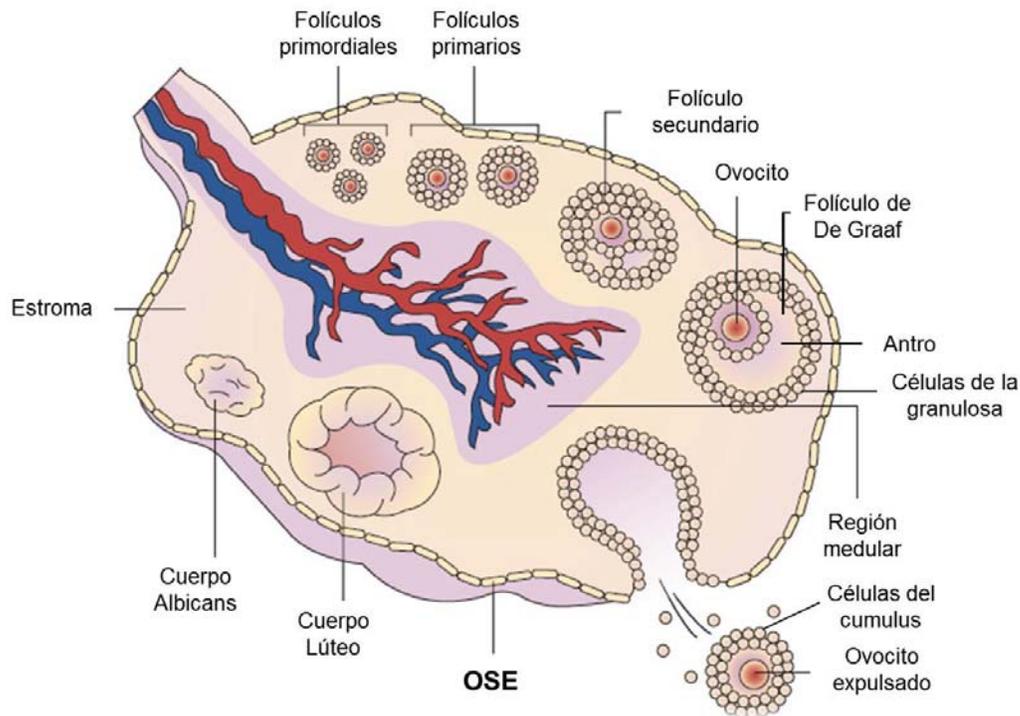


Figura 1. Esquema de la estructura del ovario de humano adulto. La superficie del ovario está revestida de una monocapa de células epiteliales, el epitelio superficial ovárico (OSE). La región medular está compuesta por grandes vasos sanguíneos, fibroblastos y músculo liso. Se muestra la población de los folículos en diferentes estadios del crecimiento, desde folículos primordiales hasta folículos de De Graaf. El folículo de De Graaf está conformado por una cavidad antral, células del cumulus, células de la granulosa, y células de la teca que rodean al ovocito. El folículo que ha ovulado se transforma en un cuerpo lúteo que secreta progesterona y posteriormente degenera en cuerpo Albicans (Modificado de Naora & Montell, 2005).

Las células del OSE están unidas lateralmente por contactos intercelulares como los desmosomas, uniones estrechas (Auersperg & Woo, 2004), uniones comunicantes (Vanderhyden et al., 2004), integrinas (Kruk et al., 1994) y caderinas (Hudson et al., 2008; Sundfeldt et al., 1997) que mantienen la integridad del

epitelio; tienen numerosas microvellosidades apicales y vesículas endocíticas que permiten la absorción de sustancias (Auersperg & Woo, 2004; Vanderhyden et al., 2004). Estudios de inmunohistoquímica han mostrado que el OSE expresa un fenotipo epitelio-mesenquimal. Por ejemplo, el OSE de humano adulto expresa a la citoqueratina 7, 8, 18 y 19, filamentos que caracterizan a los epitelios simples (Auersperg et al., 1994; van Niekerk et al., 1991). Además expresa al filamento vimentina, secreta diversos tipos de colágena (tipo I y III) (Auersperg et al., 1994), proteasas de degradación de la matriz (Kruk et al., 1994) y expresa proteínas de adhesión dependientes de calcio como la N-caderina (Davies et al., 1998) y la E-caderina (frecuente en OSE metaplásico de humano) (Hudson et al., 2008), dichas proteínas caracterizan a las células mesenquimales. La E-caderina se expresa constitutivamente en el OSE normal de cerdo (Ryan et al., 1996), de rata (Hoffman et al., 1993) y ratón; se sabe que dicha expresión es regulada por los estrógenos y la progesterona (P4) (MacCalman et al., 1994). Las caderinas no solamente median la adhesión célula-célula, también pueden regular indirectamente la expresión de genes por su asociación con las cateninas (Davies et al., 1998).

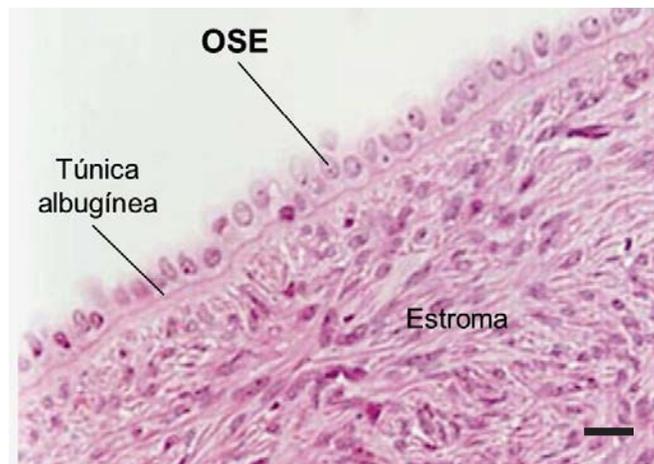


Figura 2. Corte histológico de un ovario ovino. Tinción con hematoxilina y eosina. Las células del epitelio presentan un núcleo grande con un nucléolo prominente. La túnica albugínea y el estroma ovárico subyacen al OSE. Barra de escala 10 μ m (Modificado de Murdoch & McDonnel, 2002).

Por otro lado, el OSE se caracteriza por expresar al factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Ilekis et al., 1997; Rodríguez et al., 1991), al factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Jindal et al., 1994), receptores a estrógenos (RE) y a la P4 (RP) (Lau et al., 1999).

La función que desempeña cada uno de estos factores en la regulación del crecimiento, la proliferación y la diferenciación del OSE no ha sido del todo estudiada y algunos datos han arrojado controversias respecto al papel que pudieran desempeñar *in vivo* versus los efectos observados en los modelos *in vitro*. El EGF ha sido uno de los factores más estudiados en el ovario, en donde se le han atribuido varios efectos incluyendo la inhibición de la acción de la FSH y de la producción de estrógenos (Hsueh et al., 1981), la inducción de los receptores de LH (Mondschein & Schomberg, 1981), entre otros. En el epitelio ovárico, se ha propuesto por estudios realizados en OSE de humano y de conejo (Berchuck et al., 1993; Pierro et al., 1996) que el EGF es liberado a partir de las plaquetas durante la hemorragia que acompaña al rompimiento folicular. La acumulación del EGF en el OSE adyacente al sitio de ovulación podría contribuir con la reparación tisular postovulatoria, promoviendo la proliferación celular (Auersperg et al., 2001).

Otro de los factores autocrinos que actúan en el OSE es el TGF- β , el cual contrarresta el efecto del EGF inhibiendo el crecimiento sin inducir apoptosis en el epitelio ovárico. Por el contrario, el factor de crecimiento de queratinocito (KGF) promueve su proliferación (Auersperg et al., 2001).

El factor de crecimiento hepatocitario (HGF) es producido por las células del estroma ovárico y su efecto paracrino sobre el OSE depende de la presencia o ausencia de la lámina basal. En cultivo el HGF reduce los contactos intercelulares mediados por la N-caderina e induce la apoptosis (Gulati & Peluso, 1997), mientras que cuando las células del OSE son cultivadas sobre una matriz extracelular, el HGF se comporta como un factor que induce proliferación (Hess et al., 1999). Durante la fase folicular tardía los niveles de HGF regulados por hormonas esteroideas y citocinas aumentan, posteriormente disminuyen en la ovulación y vuelven a aumentar durante la fase lútea. Estos cambios podrían

estar involucrados en el rompimiento de la pared del folículo preovulatorio y en la proliferación postovulatoria (Negami et al., 1995).

Dentro de los factores paracrinicos que estimulan la proliferación del OSE también se encuentra el factor de crecimiento de fibroblasto básico (bFGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Auersperg et al., 2001).

Con respecto a la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) se ha demostrado que actúa como un inhibidor autocrino del crecimiento del OSE, mientras que las gonadotropinas estimulan su proliferación en cultivo. Se ha propuesto que los esteroides ejercen efectos indirectos sobre la proliferación del OSE al mediar la disminución del receptor a GnRH e inducir un aumento en los niveles de HGF y EGF (Auersperg et al., 2001).

En cultivos de OSE humano se ha observado que secreta citocinas incluyendo a la IL-1 (Marth et al., 1996), IL-6 (Ziltener et al., 1993) y IL-18 (Wang et al., 2002). Dichas citocinas participan en la proliferación celular del OSE (Marth et al., 1996), el crecimiento folicular y la ovulación (Ziltener et al., 1993).

1.3 Ciclo estral

El OSE no sólo tiene la función de transportar y secretar sustancias desde y hacia la cavidad peritoneal sino que también participa de manera activa durante el rompimiento de la pared del folículo ovulatorio y en la reparación tisular postovulatoria (Auersperg & Woo, 2004).

La ovulación en mamíferos es un proceso que se encuentra finamente regulado por cambios en los niveles hormonales de las gonadotropinas y de los esteroides ováricos. Justamente son estos cambios en los niveles hormonales los que determinan, de manera particular el ciclo estral en roedores y el ciclo menstrual en humanos.

El ciclo estral fue descrito inicialmente en la rata por Long y Evans (1922), dicho ciclo tiene una duración de aproximadamente 5.4 días y comprende cuatro fases: estro, metaestro, diestro y proestro. Estos investigadores también realizaron

una descripción detallada de los tipos celulares presentes en los exudados vaginales que podían predecir con mucha exactitud la fase del ciclo estral en el que se encontraba la rata (Freeman, 1994). Butcher et al. (1974) estudiaron los niveles hormonales de las gonadotropinas y de los esteroides ováricos detectados en el plasma sanguíneo a través del ciclo estral de la rata (**fig. 3**) (Butcher et al., 1974). Dichos estudios se describen a continuación.

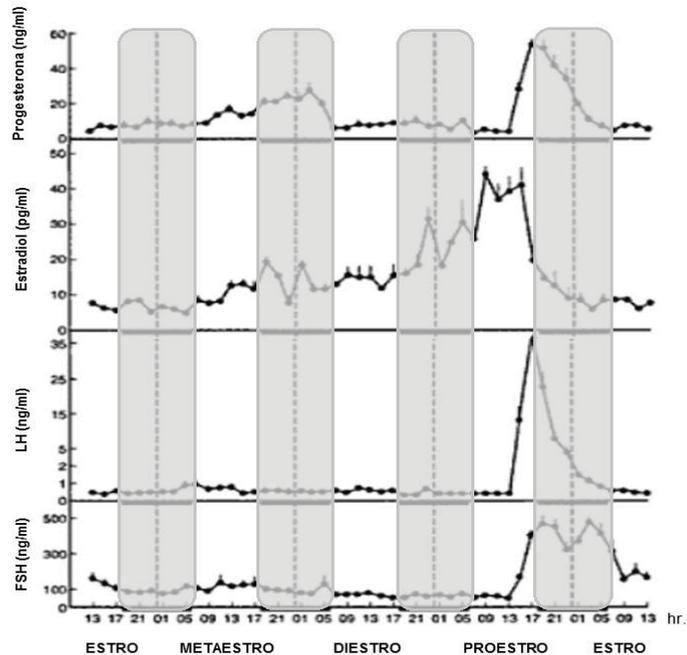


Figura 3. Niveles hormonales en el ciclo estral de la rata. Concentraciones de P4, estradiol, LH y FSH obtenidas en intervalos de 2 h del plasma sanguíneo de ratas adultas en cada día del ciclo estral. Los valores se muestran como la media \pm error estándar. Las barras verticales grises indican el período de oscuridad (Modificado de Butcher et al., 1974).

El metaestro o diestro-1, tiene una duración de 6 a 8 h, esta fase corresponde al período del desarrollo inicial del cuerpo lúteo que produce P4 durante la tarde del metaestro y el inicio de la siguiente fase. El frotis vaginal típico del metaestro muestra una gran cantidad de leucocitos y algunas células epiteliales escamosas cornificadas. Posteriormente durante la mañana del diestro (diestro-2, 55-57 h) el cuerpo lúteo maduro secreta niveles altos de P4 y esta fase finaliza con la luteolisis o degeneración del cuerpo lúteo cuando no se lleva a cabo

la fertilización del ovocito; de esta manera decaen los niveles de P4 y comienzan a aumentar los niveles de estradiol (E2). En el frotis se observan únicamente leucocitos. La siguiente fase corresponde al proestro (12-14 h), el cual comprende un período de crecimiento folicular bajo la influencia de la FSH (primer pico). Con el crecimiento de los folículos aumenta la secreción de P4 (secretada por las células de la granulosa de los folículos preovulatorios) y E2 que alcanzan un pico máximo durante la tarde del proestro, el cual constituye un asa de retroalimentación negativa que inhibe la secreción de FSH. Los picos de P4 y E2 ocurren de manera simultánea al pico preovulatorio de la LH. En el frotis vaginal es común observar células epiteliales nucleadas y en algunas ocasiones se observan células escamosas cornificadas. Estas células epiteliales cornificadas, sin núcleo y con forma irregular predominan en el frotis vaginal de las ratas en estro (del griego “*oistros*”). Durante el estro (25-27 h) los niveles de esteroides regresan a un nivel basal y surge un segundo pico de la FSH justo antes de la ovulación, que decae en el estro tardío. El pico de la LH que induce la ovulación durante la mañana del estro disminuye considerablemente durante esta fase hasta que el patrón de pulsos típico de esta hormona es ausente. Los pulsos de LH vuelven a ser generados cuando se reinicia el metaestro (Freeman, 1994).

1.4 Función del OSE en la ovulación

La ovulación es un evento biológico único que es esencial para el éxito reproductivo de la mayoría de las especies y es definido como el proceso por el cual un ovocito es liberado del ovario hacia el oviducto donde podrá ser fertilizado (Richards, 2002).

El proceso de ovulación que ocurre en respuesta al pico de la LH, se conserva en todas las especies de mamíferos. La LH inducida por los estrógenos y secretada por la adenohipófisis, actúa sobre receptores acoplados a proteína G (Espey & Lipner, 1994), ampliamente distribuidos en las células de la granulosa (Meduri et al., 1996; Rani et al., 1981), células de la teca (Braw-Tal et al., 2005; Meduri et al., 1996) y en las células del OSE (Kuroda et al., 2001). Durante este proceso la LH activa principalmente cuatro eventos involucrados en la ovulación:

1) la reanudación de la segunda división meiótica que es detenida en la metafase hasta que el ovocito sea fertilizado (Channing et al., 1978), 2) la expansión del cumulus, que implica un cambio en el citoesqueleto de las células del cumulus del folículo dominante, la síntesis de ácido hialurónico (AH) y con ello un aumento en el volumen antral (Chen et al., 1993), 3) la expulsión del complejo ovocito-células del cumulus y 4) la luteinización de las células de la granulosa y de la teca (Channing et al., 1978).

Los cambios en la estructura del folículo dominante, son los responsables de que se expanda hacia la periferia del ovario para ser ovulado (Freeman, 1994). Con ello se generan cambios estructurales en el tejido que delimita el sitio de ruptura (Parr, 1975). Inicia el adelgazamiento en las densas capas de colágena conformadas por la teca externa y la túnica albugínea, que rodean al folículo ovulatorio y al ovario completo, respectivamente (Espey & Lipner, 1994). En este momento el folículo sobresale en el ovario formando el denominado estigma o “macula pelúcida” que es el vértice de la protrusión. Poco después del pico de la LH, el flujo sanguíneo aumenta en la pared del estigma, hay una hemorragia y con ello la liberación de prostaglandinas, histamina, vasopresina y el activador del plasminógeno, que van a constituir un paso esencial para que se desencadene una cascada de señalización que culmina con la síntesis local de enzimas que degradan los componentes de la matriz extracelular. Estas enzimas que son llamadas metaloproteasas de matriz (MMP), generan una reacción que desembocará en el rompimiento de la pared del estigma (Freeman, 1994).

Justo antes de que se lleve a cabo la extrusión del ovocito, las fimbrias ciliadas del oviducto se aproximan al estigma y poco tiempo después el ovocito se desprende de las células de la granulosa y es expulsado pero no de manera aislada, sino en un complejo celular conformado por el ovocito, la zona pelúcida y las células del cumulus que lo rodean. Finalmente, el ovocito viaja a través del fluido liberado hacia el oviducto (Freeman, 1994).

Se han identificado una gran cantidad de genes que se encuentran involucrados en el proceso de ovulación, la mayoría de ellos se asocia con la reacción inflamatoria aguda (Spanel-Borowski, 2011). Se sabe que en gran parte,

las MMP son las responsables de generar esta reacción inflamatoria que culmina en la ruptura de la pared del folículo (Freeman, 1994).

Con respecto al papel del OSE en la ovulación, diversos estudios han obtenido resultados un tanto controversiales en modelos *in vivo*. En estudios realizados por el grupo de Stouffer en ovarios de primates no humanos se observó que cuando el OSE era retirado del ápice del folículo preovulatorio 36-48 h antes de la ovulación (protocolo de corto plazo), el rompimiento folicular ocurría. Esto no pasaba bajo el mismo protocolo cuando se removía todo el epitelio con detergente. Utilizando un protocolo de largo plazo, es decir cuando la epiteliectomía (con detergente) se realizaba seis semanas y 12 meses antes del análisis histológico, el rompimiento del folículo ocurría normalmente en todos los casos. En todos los grupos bajo estudio, el ciclo menstrual y los niveles de E2 y P4 permanecieron normales. Sin embargo, el epitelio fue reemplazado hasta un 33% y esto podría ser la causa de que la ovulación se siga presentando (Wright et al., 2010; Wright et al., 2011). En los ovarios de conejos a los cuales se les ha removido mecánicamente todo el epitelio, la ovulación ocurre de manera normal (Rawson & Espey, 1977). Por el contrario, han encontrado que en la rana (Schuetz & Lessman, 1982), el cerdo (Hall et al., 1993) y la oveja el proceso de ovulación requiere de la presencia del OSE (Colgin & Murdoch, 1997). Schuetz y Lessman (1982) demostraron que el epitelio superficial de los folículos ováricos en la rana era esencial para el proceso de ovulación, pues cuando se disecaba el epitelio manteniendo la teca intacta, no se observaba la ovulación en los folículos tratados con homogenados de hipófisis o P4 (Schuetz & Lessman, 1982). Colgin y Murdoch (1997) observaron que el rompimiento folicular en ovejas se inhibía cuando el OSE era removido quirúrgicamente a las 8 h de inducir la ovulación con GnRH (Colgin & Murdoch, 1997).

Se ha propuesto que el OSE participa activamente durante el proceso de ovulación (**ver figura 4**) (Murdoch & McDonnel, 2002). Durante el día del proestro el E2 aumenta la expresión de los receptores a LH localizados en las células epiteliales (Murdoch et al., 1999). La LH desencadena una cascada de señalización que activa enzimas en las células del OSE, encargadas de inducir

colagenasas que degradan la túnica albugínea y la pared apical del folículo ovulatorio. La degradación del tejido conectivo comienza en el OSE y avanza hacia la teca folicular durante la ovulación (Bjersing & Cajander, 1975).

Por un lado, las células del OSE aledañas a folículos preovulatorios secretan el activador del plasminógeno urocinasa (APu) (Colgin & Murdoch, 1997; Peng et al., 1993) en respuesta al pico de la LH (Murdoch et al., 1999). Se sabe que la administración de anticuerpos contra el APu en ovejas con ovulación inducida, inhibe el rompimiento del folículo (Colgin & Murdoch, 1997). Por otro lado, las células de la granulosa y de la teca a la vez secretan APu y el activador del plasminógeno de tejidos (APt), contribuyendo al proceso de degeneración del tejido. El APu induce un aumento localizado de la plasmina, una proteasa de serina que es sintetizada a partir del zimógeno plasminógeno. La plasmina a su vez activa colagenasas y además promueve la liberación del TNF- α (Murdoch & McDonnel, 2002). Esta citocina se localiza en el endotelio de los vasos sanguíneos que irrigan la teca y es capaz de potenciar la colagenólisis mediante la inducción de metaloproteasas (Brannstrom et al., 1995; Murdoch et al., 1997) tales como la MMP-1 en las células de la granulosa (Tadakuma et al., 1993), la MMP-2 en las células de la teca y fibroblastos (Liu et al., 1998), así como la MMP-1 (Tadakuma et al., 1993) y MMP-9 en el OSE (Rae et al., 2009); la MMP-1 degrada la teca y la túnica albugínea, mientras que la MMP-2 degrada las membranas basales favoreciendo la formación del estigma. La cascada proteolítica inducida por el TNF- α liberado de las células endoteliales conduce a la muerte celular por apoptosis en las células del OSE y en la pared apical del folículo (Murdoch et al., 1997). La onda apoptótica es seguida por necrosis, extravasación de las células sanguíneas, colapso vascular y una respuesta inflamatoria aguda (Larrick & Wright, 1990; Murdoch et al., 1999).

Por lo tanto, la ovulación involucra al menos dos mecanismos de muerte celular: en primera instancia la apoptosis mediada por el ligando de Fas (FasL) (Quirk et al., 1997) y el TNF- α en OSE (Murdoch et al., 1997) y segundo la necrosis inflamatoria que está mediada por otras citocinas (Terranova & Montgomery, 1997). Las células del OSE que sufren apoptosis tienen que ser

removidas antes de la ovulación. Luego de la expulsión del ovocito, las células del OSE contiguas a la lesión proliferan hasta reparar la superficie de ruptura (Osterholzer et al., 1985) y restaurar la matriz extracelular de la túnica albugínea subyacente ya que asumen características fenotípicas mesenquimales (Vanderhyden et al., 2004).

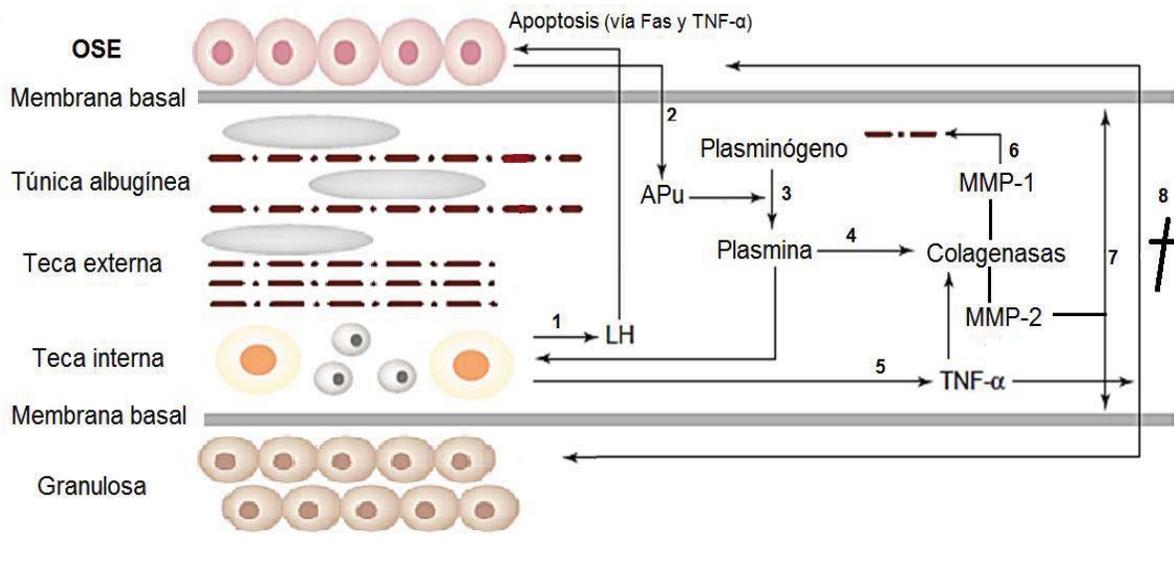


Figura 4. Degeneración tisular durante la ovulación en mamíferos. La LH procedente de los vasos sanguíneos que irrigan la teca (1), actúa a través de sus receptores localizados en la membrana de las células del OSE, para estimular la secreción del APu (2). El plasminógeno intersticial es convertido a plasmina por el APu (3), activando colagenasas (4) y al TNF-α (5), que a su vez activa colagenasas como la MMP-1 que degrada la teca y la túnica albugínea (6). La MMP-2 degrada las membranas basales (7). El TNF-α y la activación de Fas inducen la apoptosis en las células del OSE (8) formando el estigma (Modificado de Murdoch & McDonnel, 2002).

Estudios *in vitro* han demostrado que una alta concentración de estrógenos induce proliferación y suprime la apoptosis en las células de OSE. Esto sugiere que los altos niveles de estrógenos liberados en el fluido folicular durante el momento de la ovulación, pueden intervenir en la supervivencia de las células del OSE aledañas a la lesión, que no han sufrido algún cambio que comprometa su función (Murdoch & Van Kirk, 2002).

En forma paralela, con el envejecimiento, el ovario tiende a adoptar un contorno irregular debido a invaginaciones del epitelio en la corteza del ovario. Estas forman quistes de inclusión en el compartimento del estroma luego de la proliferación post-ovulatoria del OSE, la atresia folicular o algún proceso de inflamación. Estos arreglos epiteliales pueden o no estar acompañados por transformaciones metaplásicas y neoplásicas que originan diversos tipos de cáncer epitelial (Chuaire-Noack et al., 2008; Vanderhyden et al., 2004).

1.5 Aspectos fisiopatológicos del OSE

El OSE está expuesto constantemente a los cambios cíclicos en las concentraciones hormonales y factores de crecimiento, a las rupturas periódicas en los sitios de ovulación y a la reparación postovulatoria, bajo este panorama las células se vuelven más vulnerables a la acumulación de mutaciones que podrían contribuir a la carcinogénesis (Auersperg & Woo, 2004).

A partir de los amplios estudios realizados por Wells (1872) se pudo constatar que es precisamente en el OSE donde se origina el 90% de los cánceres de ovario en humano (Auersperg et al., 2001; Murdoch & McDonnel, 2002). En contraste con el peritoneo pélvico extraovárico, el OSE mantiene un fenotipo celular multipotencial que puede seguir diversas vías de diferenciación, una de ellas es la transición epitelio-mesénquima (TEM) como parte de los procesos de reorganización tisular que se presentan luego del proceso de ovulación. Las células del OSE en el sitio de ruptura están expuestas al EGF, bFGF (Xie et al., 2011), PDGF (Patel et al., 2010) y TGF- β que inducen TEM (Zhu et al., 2010). Se ha propuesto que la TEM podría funcionar como un mecanismo de homeostasis que permite incorporar al estroma a las células del OSE atrapadas dentro del ovario durante la ovulación. Las células que no sufren la diferenciación a mesénquima y mantienen las características epiteliales forman agregados que dan origen a los quistes de inclusión en el estroma. Los quistes de inclusión pueden conducir a cambios metaplásicos y neoplásicos, esto dependerá de varios factores como la ovulación, el nivel de estrógenos y gonadotropinas, la predisposición genética y agentes carcinogénicos del ambiente que comprometen la fisiología del

ovario (Vanderhyden et al., 2004). Cabe mencionar que los quistes de inclusión se encuentran en un microambiente que favorece la progresión neoplásica, debido a que el OSE en estas condiciones (en ausencia de la túnica albugínea) hace contacto directo con las células del estroma, por lo que queda expuesto a factores de crecimiento y a citocinas; algunos de estos factores son secretados inclusive por las mismas células del OSE (Hudson et al., 2008).

En el curso de la formación de los quistes de inclusión y de la transformación neoplásica, el OSE puede diferenciarse en epitelio Mülleriano (oviducto/trompas de Falopio, endometrio y endocérvix) con el potencial de progresar a carcinomas en donde el OSE pierde marcadores mesenquimales (Wang et al., 2003).

Dentro de los marcadores de diferenciación epitelial se encuentra la E-caderina, que raramente se expresa en OSE normal de humano, pero es común encontrarlo en los carcinomas primarios derivados de OSE (Hudson et al., 2008).

1.6 El ATP como transmisor intercelular

El descubrimiento del papel que desempeñan el nucleósido de adenosina (Ado) y sus nucleótidos, AMP (monofosfato de adenosina), ADP (difosfato de adenosina) y ATP (trifosfato de adenosina), como un sistema involucrado en procesos de señalización intracelular, fue hecho por Drury y Szent-Györgyi (1929) cuando demostraron que la adenosina y el AMP podían reducir la contractilidad cardiaca, incrementar la vasodilatación coronaria, inhibir la contracción intestinal, y producir sedación en el sistema nervioso central (Drury & Szent-Györgyi, 1929). Emmelin y Feldberg (1948) por su parte mostraron la acción extracelular del ATP sobre los ganglios autónomos (Emmelin & Feldberg, 1948), y en 1959 Holton realizó estudios sobre la liberación del ATP durante la estimulación de los nervios sensoriales del oído de mamífero (Holton, 1959). No fue hasta 1972 que Burnstock retomó el papel de las purinas como moléculas mensajeras extracelulares (Burnstock, 2009; Jarvis & Williams, 2000) y planteó la hipótesis de la transmisión purinérgica derivada de la neurotransmisión no adrenérgica no colinérgica o NANC en el músculo liso de mamífero (Burnstock et al., 1972). Más tarde se encontró

una liberación no sólo de las neuronas entéricas NANC si no también, de las terminales nerviosas simpáticas (Su et al., 1971; Westfall et al., 2002), y en 1976 se postuló la existencia de la cotransmisión (Burnstock, 1976).

El ATP es almacenado en vesículas sinápticas y co-liberado con el glutamato, ácido gamma-aminobutírico (GABA), dopamina, noradrenalina, serotonina y acetilcolina en diferentes poblaciones neuronales del sistema nervioso central (Burnstock, 2007).

Por otro lado, prácticamente todas las células eucariotas liberan ATP y expresan en su membrana receptores activados por nucleótidos lo que implica que, el ATP y los nucleótidos son moduladores extracelulares ubicuos de las funciones celulares. La liberación basal de ATP puede incrementarse por una mínima perturbación en la célula (Corriden & Insel, 2010), a través de estímulos químicos o mecánicos y ejercer acciones paracrinas y/o autocrinas (Saldaña et al., 2005; Saldaña et al., 2009; Boucher et al., 2010).

Los nucleótidos y la adenosina pueden ser liberados por casi todos los tipos celulares, ante una gran variedad de estímulos como la isquemia, la hipoxia, el estrés mecánico, procesos de inflamación o cambios osmóticos (Bodin et al., 2001). Los mecanismos de liberación parecen ser diversos e incluye la liberación vesicular, transportadores ABC, canales maxi-ión, el receptor P2X7, canales de conexina, y canales mecanosensibles de panexina (Bao et al., 2004; Burnstock, 2009), la expresión de un determinado mecanismo de liberación parece ser específico de cada tipo celular. Cuando el ATP es liberado hacia el espacio extracelular éste puede ser rápidamente hidrolizado a adenosina por medio de las ecto-nucleotidasas (**fig. 5**) y modular la liberación de los cotransmisores simpáticos a través de un mecanismo de retroalimentación negativa. Este mecanismo ya había empezado a ser elucidado por Burnstock (1978) cuando se conoció la rápida hidrólisis del ATP, con ello propuso que la presinapsis expresaba receptores específicos a adenosina (P1) y la postsinapsis receptores a ATP (P2) (Burnstock, 2009; Westfall et al., 2002).

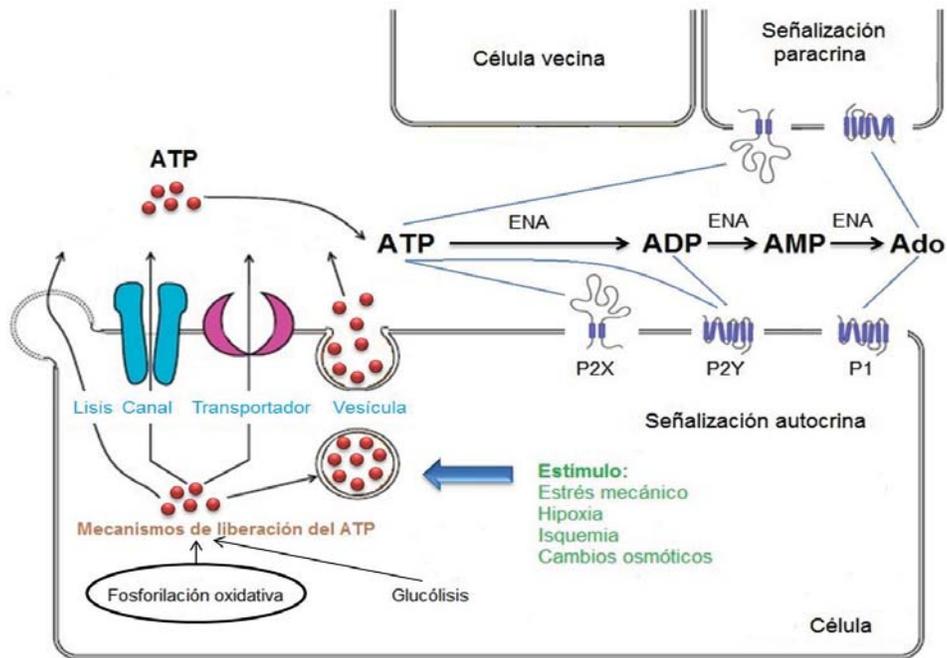


Figura 5. Mecanismos de liberación del ATP y la comunicación autocrina y paracrina. El ATP como molécula de señalización intercelular puede ser liberado hacia el espacio extracelular mediante varios estímulos como el estrés mecánico, la hipoxia, la isquemia y los cambios osmóticos en la célula, a través de mecanismos, tales como la lisis celular, la apertura de canales iónicos, activación de transportadores y la liberación de vesículas. El ATP extracelular puede actuar de manera paracrina en las células vecinas o de manera autócrina activando receptores purinérgicos en la membrana de la misma célula que lo libera. El ATP es degradado en el espacio intercelular por ecto-nucleotidasas (ENA) que lo convierten en ADP, AMP y finalmente en adenosina (Ado), moléculas que también activan receptores membranales (Modificado de Sabirov & Okada, 2005).

La diversidad de receptores a nucleótidos de adenosina, de ecto-nucleotidasas y de cinasas que regulan las concentraciones extracelulares de ATP establecen un sistema versátil, finamente regulado que facilita la generación de una amplia gama de respuestas celulares (Corriden & Insel, 2010).

1.7 Sistema purinérgico

Las acciones extracelulares de la adenosina y los nucleótidos son mediadas por dos familias de receptores purinérgicos, los receptores P1 y P2,

respectivamente (**fig. 6**). En el presente trabajo haremos referencia exclusivamente a los receptores P2, de los cuales se han clasificado dos subfamilias, los receptores P2X que son canales iónicos activados por ligando y los P2Y que son receptores de siete pases transmembranales, acoplados a proteínas G (Burnstock, 2009).

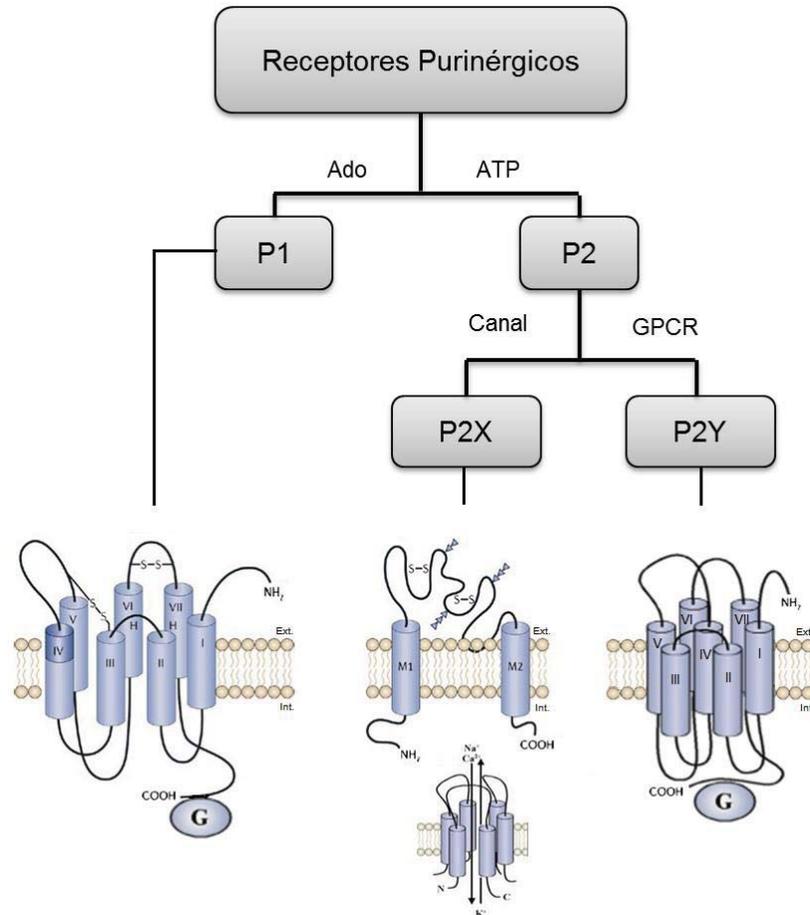


Figura 6. Familia de receptores purinérgicos activados por los nucleótidos de adenosina. La familia de receptores P1 activados por adenosina (Ado), están constituidos por siete pases transmembranales y se encuentran acoplados a proteínas G. La familia de receptores P2 activados por ATP o ADP, se subdividen en las subfamilias P2X y la P2Y. Los P2X son receptores canal activados por ligando, cada trímero está constituido de subunidades conformadas por dos dominios transmembranales (M1 y M2). Mientras que la subfamilia P2Y son receptores de siete pases transmembranales acoplados a proteínas G. S-S, puentes disulfuro; I-VII, dominios transmembranales (Modificado de Fields & Burnstock, 2006).

La estructura de los receptores P2Y consiste en siete segmentos transmembranales, un amino terminal extracelular y un carboxilo terminal intracelular. Los receptores P2Y reconocen como agonistas selectivos a distintos nucleótidos de adenina o uridina. El grupo mayoritario de receptores P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 y P2Y11 está acoplado a proteínas Gq, que activa a la fosfolipasa C (PLC) y eleva los niveles de inositol trifosfato (IP_3) y el diacilglicerol (DAG) que activa a la proteína cinasa C (PKC). El IP_3 promueve la movilización de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares. El receptor P2Y11 se acopla además a la proteína Gs, activando a la adenilato ciclasa (AC) y con ello aumentando la producción de AMP cíclico (AMPc). Los receptores P2Y12, P2Y13 y P2Y14 están acoplados a la proteína Gi que inhibe a la AC, regulan canales iónicos, y activan a la cinasa de fosfolípidos (PI3K) (Erb et al., 2006; von Kügelgen & Wetter, 2000). Las cascadas intracelulares activadas por estos receptores regulan diversos procesos celulares incluyendo la proliferación, la apoptosis, la diferenciación, el metabolismo y la migración celular (Burnstock, 2009).

Los receptores P2X (**ver figura 7**) son canales iónicos triméricos, cada subunidad posee dos dominios hidrofóbicos transmembranales, formados por 20 a 30 aminoácidos. Estos dominios (TM1 y TM2) son responsables de la apertura del canal y formación del poro, respectivamente. Ambos están unidos entre sí por un extenso segmento extracelular que contiene residuos conservados, incluyendo 10 cisteínas que forman puentes disulfuro, 13 glicinas y 2-6 asparaginas que son sitios de glicosilación. Además el segmento extracelular contiene el sitio de unión al ATP y una región hidrofóbica importante para su regulación por magnesio, zinc y otros cationes. El amino y carboxilo terminales se encuentran hacia el interior de la célula y contienen sitios consenso de fosforilación por la PKC y la proteína cinasa A (PKA) que modulan su actividad. Tres subunidades iguales o diferentes forman receptores homoméricos o heteroméricos P2X funcionales. Se han identificado siete subunidades del P2X1 al P2X7. Estos receptores median el influjo de sodio y Ca^{2+} y el eflujo de potasio conduciendo a una despolarización que activa canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje lo que conlleva a un aumento significativo en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$). Estos procesos de

señalización tienen implicaciones funcionales importantes en la propagación del impulso nervioso y la contracción muscular. Notablemente, ni el ADP, ni la Ado, ni los nucleótidos de uridina activan a estos receptores (Erb et al., 2006).

1.8 El receptor P2X7

El receptor ionotrópico P2X7 denominado inicialmente P2Z, fue identificado por primera vez en los mastocitos de rata (Cockcroft & Gomperts, 1979) y posteriormente fue clonado por el grupo de Surprenant, a partir del cerebro de rata (Surprenant et al., 1996). A diferencia de los demás receptores P2X, éste forma un canal homomérico (Torres et al., 1999) que al ser activado presenta características muy peculiares que lo distinguen de los otros miembros de la familia. Entre ellas se conoce que 1) el único ligando endógeno capaz de activarlo es el ATP en concentraciones en el rango alto μM (Chakfe et al., 2002), 2) la respuesta inducida por la estimulación del receptor, no desensibiliza en presencia del agonista (Cario-Toumaniantz et al., 1998), 3) la activación sostenida del receptor es capaz de inducir la formación reversible del denominado “megaporo” que permite el paso de moléculas de hasta 900 Da y que se ha postulado está constituido por la asociación del receptor P2X7 con la panexina 1 (Panx1) (Pelegri & Surprenant, 2006), 4) se ha observado en distintos sistemas celulares que esta activación induce la muerte celular por apoptosis (Di Virgilio, 1995; Schulze-Lohoff et al., 1998; Vázquez-Cuevas et al., 2006).

El receptor P2X7 se expresa abundantemente en células de linaje hematopoyético, incluyendo mastocitos (Wareham et al., 2009), eritrocitos (Sluyter et al., 2004), monocitos, macrófagos periféricos, linfocitos B (Collo et al., 1997), linfocitos T (Chused et al., 1996) y células de Langerhans epidérmicas (Georgiou et al., 2005). En el sistema nervioso central (SNC) el receptor se encuentra expresado en las células de Schwann (Colomar et al., 2001), astrocitos (Kim et al., 2001) y microglía (Chakfe et al., 2002; Ferrari et al., 1997a). En los macrófagos (Ferrari et al., 1997b) y la microglía el receptor juega un importante papel en la liberación de la IL-1 β (Chakfe et al., 2002; Ferrari et al., 1997a).

El receptor P2X7 está constituido por tres módulos: 1) el módulo que censa la unión al ATP, 2) la región del poro del canal embebido en la membrana y 3) el módulo que censa señales intracelulares y que se encuentra directamente relacionado con el dominio transmembranal dos (TM2), el cual es esencial para la función del canal. Por lo que, la apertura del poro está bajo el control de una porción extracelular y otro en la región citoplasmática. Con respecto al COOH se ha descrito una variedad de proteínas que interactúan a este nivel, pero aún no es claro cómo esta interacción regula la apertura del canal. La presencia de los tres carboxilos en el homotrímero que forma al receptor, se requieren para la completa actividad del canal (Becker et al., 2008).

En la mayoría de las células, bajo condiciones normales, la concentración intracelular de ATP se encuentra en el rango de ~1 mM, mientras que en el medio extracelular la concentración de ATP es baja (μM) pero es suficiente para activar respuestas celulares (Corriden & Insel, 2010).

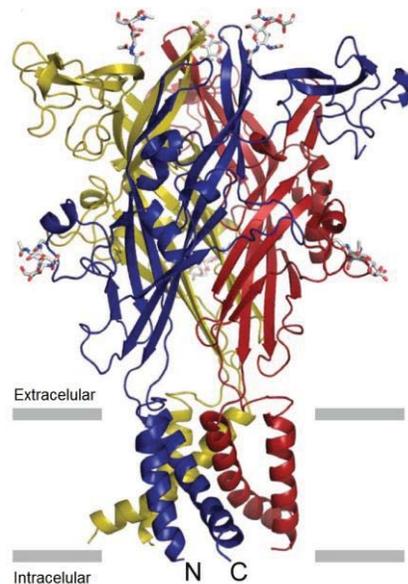


Figura 7. Estructura de los receptores P2X. Estructura del cristal del receptor homotrímérico ΔzfP2X4 . Cada subunidad, representada con un color diferente, está conformada por dos regiones transmembranales, el asa extracelular externa y el amino (N) y carboxilo (C) terminal intracelular. Se muestra la N-acetilglucosamina y los residuos de asparagina glicosilados (Modificado de Kawate et al., 2009).

La señalización de ATP pudo haber surgido como una señal de peligro en respuesta a la liberación masiva de ATP que ocurre a partir de células que han sufrido algún daño es decir, durante procesos de inflamación, daño tisular (hipoxia o isquemia) o presencia de patógenos (LPS: lipopolisacárido, endotoxina derivada de bacterias) (Corriden & Insel, 2010). Por ejemplo, los neutrófilos en presencia de componentes microbianos, liberan una concentración alta de ATP que actúa de manera autocrina para dirigir la migración celular y la fagocitosis (Chen et al., 2006). Las células apoptóticas lo hacen como una señal paracrina de reconocimiento para promover la fagocitosis (Elliott et al., 2009). Los macrófagos y la microglía liberan al igual concentraciones altas de ATP hacia el espacio extracelular que activarán receptores purinérgicos en células vecinas.

La estimulación del receptor P2X7 induce respuestas que dependen principalmente del influjo del Ca^{2+} . Entre las proteínas señalizadoras reguladas por la actividad el receptor P2X7 podemos mencionar a la proteína G pequeña Rho, la vía de Rho/p38 se encuentra involucrada en la secreción de IL-1 β a través de la reorganización de los filamentos de actina (Di Virgilio, 2007; Potucek et al., 2006).

Por otro lado, se sabe que la activación de P2X7 en varios modelos celulares induce la fosforilación de las cinasas ERK, por mecanismos que podrían involucrar la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidermal y/o otros elementos de señalización como la PKC (Steffano et al., 2005). También se ha demostrado que en osteoblastos estimula la actividad de factores de transcripción como el factor nuclear- κ B (NF- κ B) que regula la expresión de genes inflamatorios como la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y la sintetasa de óxido nítrico (iNOS) (Genetos et al., 2011).

Por otro lado, se ha visto que la activación de la fosfolipasa D (PLD) inducida por la estimulación del receptor P2X7, activa a la caspasa 1 que lleva a cabo el corte de la pro-IL-1 β en IL-1 β madura la cual será liberada de la célula. Se sabe que las citocinas pro-inflamatorias a su vez regulan a la alta la expresión del receptor P2X7 e incrementan su sensibilidad al ATP (Narcisse et al., 2005). En este contexto, el ATP como transmisor intercelular actúa como una señal pro-

inflamatoria durante la inflamación aguda que ocurre en tejidos infectados o con algún daño (Corriden & Insel, 2010).

Las funciones anteriormente mencionadas para el receptor P2X7 se las han atribuido al doble papel que ejerce, 1) como canal catiónico activado por ligando y 2) como un poro citolítico (Costa-Junior et al., 2011).

El orden de potencia de diferentes agonistas, de la activación del receptor es: 3'-O-(4-benzoilo) benzoilo ATP (BzATP) >> ATP >> 2-metil ATP (2MeSATP) > ATP, adenosina 5'-O-(3-tiotrifosfato) (ATP γ S) (Ralevic & Burnstock, 1998).

Al igual que con los otros receptores P2X, los cationes divalentes inhiben al receptor P2X7. El antagonista más potente es el clorhidrato de 3-[[5-(2,3-diclorofenil)-1H-tetrazol-1-il] metil] piridina (A438079) (Nelson et al., 2006). El KN-62 (1-[N,O-bis(5-isoquinolina sulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4-fenilpiperazina) con una IC₅₀ de aproximadamente 12 nM. El 2',3'-Dialdehído ATP (ATP oxidado) es un antagonista irreversible cuyo efecto requiere de una alta concentración (Ralevic & Burnstock, 1998).

1.9 Apoptosis en el ovario

La apoptosis es la muerte celular programada que ocurre en las células eucarióticas y es observada en una variedad de condiciones fisiológicas y patológicas, por ejemplo es esencial en la embriogénesis, en el desarrollo del sistema inmune y del sistema nervioso sin embargo, se presenta también en condiciones de estrés, isquemia y en la neurodegeneración. La apoptosis es un proceso celular genéticamente regulado que interviene en la homeostasis de la célula. Se caracteriza por la fragmentación del material genético, la condensación del citoplasma en pequeñas vesículas y la aparición de cuerpos apoptóticos (Kim, 1995).

Para que inicie un proceso apoptótico, la célula debe recibir alguna señal extracelular (vía extrínseca) o intracelular (vía intrínseca), que activa la maquinaria enzimática constituida por las caspasas, enzimas que pertenecen al grupo de las cisteín-proteasas. Ambas vías convergen en la caspasa 3. La vía extrínseca se activa cuando el FasL se une a su receptor (Fas) y recluta a un complejo de

proteínas adaptadoras, que permiten la unión de la pro-caspasa 8, que al ser activada, activa a las caspasas efectoras 3, 6, 7 y a una proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2 llamada Bid. Ésta induce la liberación de citocromo C y Apaf-1 (factor activador de la proteasa apoptótica) de la mitocondria, formando el apoptosoma y activando la vía intrínseca (Sánchez-Torres & Diosdado-Vargas, 2003).

La vía apoptótica intrínseca puede activarse cuando se modifica el potencial mitocondrial, por ejemplo por una sobrecarga citoplásmica de Ca^{2+} , este proceso induce la translocación de miembros de la familia Bcl-2 como Bax a la mitocondria. Se da con ello una liberación de citocromo C hacia el citoplasma, donde se forma el apoptosoma que recluta y activa a la pro-caspasa 9 que a su vez, activa a las caspasas 3, 6 y 7, las cuales son las responsables de los cambios bioquímicos y estructurales de las células en apoptosis que finalmente son fagocitadas (Sánchez-Torres & Diosdado-Vargas, 2003).

Esta forma de muerte celular, que es responsable de eliminar células dañadas, senescentes o potencialmente dañinas para el organismo, es esencial para el buen desarrollo y funcionamiento del ovario en vertebrados e invertebrados (Tilly et al., 2004). La apoptosis en el ovario ha sido ampliamente estudiada a través del ciclo estral (Slot et al., 2006), en las células de la granulosa (Inoue et al., 2011), células de la teca (Slot et al., 2006), en el OSE (Murdoch & McDonnell, 2002) y en el cuerpo lúteo (Sakamaki et al., 1997), en donde se le ha asociado con procesos como la atresia folicular, la regresión del cuerpo lúteo y la ovulación, por lo que recibe influencia de la secreción hormonal (Murdoch & Van Kirk, 2002).

En un estudio empleando extractos de tejido ovárico de rata se midieron a través del ciclo estral los niveles de expresión proteica de distintas moléculas apoptóticas y anti-apoptóticas. Los niveles de expresión de las proteínas Fas, Bax y la caspasa 3 se encontraron altos alrededor del diestro y bajos durante el metaestro. En contraste, los niveles de expresión del ligando Fas y la proteína Bcl-2 son bajos durante el diestro y altos en el metaestro (Slot et al., 2006). Esto sugiere que el proceso de muerte celular por apoptosis se presenta durante el diestro que precede a la ovulación pero no en el día del metaestro.

Con respecto a las células del OSE, se conoce que llevan a cabo ciclos de proliferación y degeneración asociados al proceso de ovulación. Las células epiteliales adyacentes a los folículos preovulatorios están expuestas a agentes inflamatorios, condición que se acompaña de un aumento en la apoptosis (Murdoch et al., 2001). Estudios *in vitro* señalan la inducción de la apoptosis mediada por Fas en células de OSE de ratón que han sido estimuladas con el factor IFN- γ (Quirk et al., 1997).

Durante el proestro, el ligando Fas y la proteína Bax se expresan mayormente en las células del OSE que rodean al folículo que será ovulado a diferencia del resto de las células epiteliales (Slot et al., 2006). En contraste, las células del OSE localizadas en los límites de la ruptura folicular sobreviven y en ellas se ha detectado la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2. Probablemente es un mecanismo de protección ante el daño causado por la ovulación que podría contribuir con la posterior reparación de la lesión (Murdoch et al., 2001). Por otro lado, las células epiteliales que expresan a la caspasa-3 activa, solo se encuentran en el sitio postovulatorio, señal que finaliza el proceso de apoptosis (Slot et al., 2006). El nivel de expresión de las distintas proteínas apoptóticas y anti-apoptóticas en el ovario, reflejan mecanismos fisiológicos de supervivencia para asegurar la ovulación de un folículo dominante, la formación de un cuerpo lúteo y la reparación del OSE luego de la ovulación (Slot et al., 2006; Tilly et al., 2004).

1.10 El sistema purinérgico en el ovario

El desarrollo del ovario está controlado por factores tanto endócrinos como neuronales. Durante la embriogénesis los mecanismos neuroendócrinos, como la estimulación por péptidos y algunos neurotransmisores (Ahmed et al., 1986), regulan diversos procesos celulares entre ellos, la inducción de la actividad de ciertas enzimas que posteriormente participaran en la esteroidogénesis aunque el ovario aún sea incapaz de responder a las gonadotropinas (George & Ojeda, 1987). La inervación simpática del ovario ocurre antes de que los folículos primordiales comiencen a desarrollarse (Malamed et al., 1992) y de ella derivan

dos vías: el plexo ovárico y el nervio ovárico superior (Lawrence & Burden, 1980). En diversos estudios se ha mostrado que la inervación simpática influye sobre el crecimiento folicular y por ende sobre la función ovulatoria (Burden, 1985), por ejemplo, a través de la regulación de la actividad de enzimas esteroidogénicas durante la fase folicular (Delgado et al., 2010). Aunque en estos trabajos los efectos observados son atribuidos principalmente a la norepinefrina o a la acetilcolina, es posible que el ATP actuando como co-transmisor pudiera mediar en estos efectos.

Como ya se mencionó, el daño celular puede incrementar la liberación de ATP que actúa de manera local sobre los receptores purinérgicos de las células vecinas (Saldaña et al., 2005; Saldaña et al., 2009; Boucher et al., 2010). De manera particular, se conoce que en el folículo ovárico de la rana *Xenopus laevis* el estrés mecánico es capaz de generar corrientes entrantes rápidas de cloro (I_{mec}) que dependen de la apertura de canales de Cl dependientes de Ca^{2+} (Arellano et al., 2011), las cuales son debidas a la activación de receptores purinérgicos que se expresan en las células foliculares y que son estimulados de manera paracrina por el ATP que es liberado a partir del ovocito (Saldaña et al., 2009). También la liberación continua de ATP desde el ovocito, actuando de manera paracrina en el folículo, provoca la apertura de canales de K^+ que son activados a través de un aumento de los niveles de AMPc en las células foliculares (Saldaña et al., 2005), estas corrientes de K^+ han sido involucradas en la regulación del proceso de maduración meiótica del ovocito (Wibrand et al., 1992). Ha sido postulado que la activación de las corrientes de K^+ por ATP es el resultado de la estimulación de un receptor heteromérico formado por subunidades P1 y P2Y en las células foliculares (Arellano et al., 2009).

En el folículo ovárico de ratón se ha caracterizado la expresión de diversos receptores purinérgicos incluyendo el P2Y2 expresado en las células del cumulus y de la granulosa. De manera similar a lo observado en las preparaciones de rana, la aplicación de ATP extracelular induce una respuesta despolarizante en el folículo de ratón como consecuencia de la activación de los receptores P2Y2, los cuales pueden generar dos tipos de corrientes, una de Cl^- dependiente de Ca^{2+} y

una corriente catiónica (Arellano et al., 2002); lo cual parece indicar que los mecanismos básicos de respuesta a sustancias purinérgicas, han sido conservados evolutivamente en los folículos ováricos desde anfibios a mamíferos. También ha sido demostrada la expresión específica del receptor P2X7 en las células de la teca de mamífero, y que su activación provoca la muerte apoptótica de este tipo celular (Vázquez-Cuevas et al., 2006). En este mismo tipo celular, la estimulación por UTP de receptores P2Y2 y P2Y6 induce su proliferación a través de una vía en la que participa la PKC y las ERKs (Vázquez-Cuevas et al., 2010); la información actual indica que la señalización purinérgica presenta una gran diversidad en las células somáticas del folículo de mamífero, y que su estimulación parece controlar al menos dos de los principales procesos celulares implicados en la foliculogénesis, la proliferación y la muerte celular.

2. ANTECEDENTES

Nuestro grupo de trabajo ha obtenido evidencias de la expresión de receptores purinérgicos en el OSE. A través de ensayos de inmunofluorescencia, se detectó la expresión de los receptores P2X1, P2X4, P2X7 y P2Y2 en rebanadas de ovario de ratón (Juárez, 2006).

Para profundizar en estas observaciones se desarrolló la obtención de cultivos primarios de OSE de ratón; en este modelo *in vitro* se han realizado estudios funcionales evaluando cambios en la $[Ca^{2+}]_i$, en respuesta a agonistas purinérgicos por microscopía de fluorescencia; nuestras observaciones han evidenciado la expresión funcional de varios receptores P2Y y del receptor P2X7 (Lara-Mejía, 2011; Vázquez-Cuevas et al., 2006; Vázquez-Cuevas et al., 2010; Vázquez-Cuevas et al., 2012). Las características del receptor P2X7 sugiere que su expresión en el OSE puede tener importantes implicaciones fisiopatológicas.

Sin embargo, esta información aún no permite integrar aspectos que involucran al ovario completo, por ejemplo la interacción de las células del OSE con los compartimentos folicular, luteal o intersticial del ovario. En este proyecto estamos interesados en analizar la regionalización de la expresión de los receptores purinérgicos de tipo P2X7 y su posible interacción con los folículos adyacentes en el ovario *in situ* y obtener evidencia funcional de estos receptores en preparaciones que no involucren el aislamiento de las células del OSE.

3. JUSTIFICACIÓN

El epitelio ovárico superficial es un participante activo en el proceso ovulatorio, regulando la remodelación tisular que permitirá la expulsión del ovocito y la cicatrización postovulatoria; del mismo modo, un amplio conjunto de evidencias señala que es una estructura muy importante en la carcinogénesis ovárica. No obstante diversos aspectos de su biología básica no han sido entendidos por completo, específicamente los efectos celulares que diferentes sistemas de comunicación celular ejercen sobre él.

El interés particular del presente estudio es entender algunos aspectos de la comunicación purinérgica en el OSE. Nuestro grupo de trabajo ha puesto en evidencia la expresión funcional de receptores purinérgicos en las células aisladas del OSE; también nuestros estudios sugirieron la expresión específica del receptor P2X7 en esta importante capa celular. Sin embargo, aún no se cuenta con información que nos indique el probable papel fisiológico de este receptor en el ovario y su relación con el ciclo reproductivo.

La propuesta de este trabajo por lo tanto es la de documentar la regionalización de la expresión del receptor P2X7 en el OSE, el comportamiento de esta expresión a lo largo del ciclo estral, la posible relación que tiene la expresión de P2X7 con respecto al estadio de desarrollo de los folículos adyacentes, así como los efectos provocados por su activación en preparaciones *in vivo*.

La mayor parte de los estudios sobre el OSE se han generado utilizando cultivos primarios, aunque esta información es valiosa, se ha observado que los hallazgos observados *in vitro* no son consistentes con estudios *in vivo*, un ejemplo muy claro es el papel trófico de las gonadotropinas sobre el OSE humano.

Dados los antecedentes presentados, es evidente la importancia del estudio de la comunicación celular en el OSE, por lo que la comunicación mediada por sustancias purinérgicas y la activación de receptores tales como el P2X7 podrían ser de importancia para comprender cabalmente la fisiología del OSE así como entender los mecanismos involucrados en el desarrollo de patologías en el ovario.

4. HIPÓTESIS

La expresión del receptor P2X7 en el epitelio superficial ovárico de mamífero varía durante el ciclo estral y está relacionada con las características de la población folicular adyacente.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar *in situ* la expresión del receptor purinérgico P2X7 en el epitelio superficial ovárico de ratón y evaluar la activación de respuestas celulares específicas inducidas a través de la estimulación directa con agonistas y antagonistas selectivos.

5.2 Objetivos Particulares

1. Determinar la expresión de los marcadores de epitelio citoqueratina y N-caderina a través de ensayos de inmunofluorescencia en el OSE de ratón.
2. Determinar la expresión del receptor P2X7 en rebanadas del ovario de ratón por medio de inmunofluorescencia y analizar el posible patrón diferencial de expresión durante las distintas etapas del ciclo estral y en regiones particulares del ovario.
3. A través de la inyección intrabursal, estimular a las células del OSE aplicando agonistas purinérgicos selectivos para los receptores P2X7 y analizar sus efectos sobre la apoptosis.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Animales y registro del ciclo estral

En este estudio se emplearon ratones hembra vírgenes de la cepa C57BLACK/6 de 30 días de edad. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones controladas de luz (12 h luz/ 12 h oscuridad) y de temperatura (22°C). Se monitoreó el ciclo estral de las ratonas mediante el análisis diario del frotis vaginal realizado a la misma hora del día (11:00 a.m.), el exudado se inició a los 30 días de edad, cuando los animales presentan la apertura vaginal. Los frotis fueron teñidos por 10 min con hematoxilina y 20 s con eosina y observados con el objetivo 20X de un microscopio invertido de campo claro (Olympus, PA, USA).

Los animales que mostraron al menos tres o cuatro ciclos regulares de cuatro días cada uno, fueron anestesiados y posteriormente perfundidos durante la mañana de cada día del ciclo estral a los 45-60 días de edad. Los ovarios fueron disecados para su posterior inclusión en parafina o en medio crioprotector *Tissue-Tek*.

6.2 Reactivos

El fármaco BzATP y el paraformaldehído se obtuvieron en SIGMA-Aldrich, Inc. El A438079 fue adquirido en Tocris Bioscience. Las diferentes sales (NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, y otras) utilizadas en las soluciones fueron de J. T. Baker, Inc. El estuche comercial *Dead End Fluorometric TUNEL System* empleado en los ensayos de fragmentación del ADN fue adquirido en Promega, Co. El medio de inclusión *Tissue-Tek* fue adquirido en Sakura Finetek, CA EUA.

Para los ensayos de inmunofluorescencia se emplearon anticuerpos primarios policlonales anti-ratón, generados en conejo: N-caderina fue adquirido en Abcam, Inc. y P2X7 en Alomone Labs., (Jerusalem, Israel). El anticuerpo primario monoclonal TROMA-I (citoqueratina Endo-A) generado en ratón, fue adquirido en Developmental Studies Hybridoma Bank (Department of Biology, The University of Iowa).

Los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo conjugados a un fluorocromo y generados en cabra, fueron obtenidos de Invitrogen, Co.; uno de los anticuerpos está acoplado a Alexa Fluor 488 y el otro anticuerpo secundario está conjugado a Cy5. Un tercer anticuerpo secundario anti-IgG de ratón empleado, estaba conjugado al fluorocromo fluoresceína (FITC), fue generado en cabra y obtenido de Invitrogen, Co. El medio de montaje *Vectashield* se obtuvo de Vector Laboratories, Inc. y contiene el fluorocromo DAPI. El yoduro de propidio fue adquirido en Life technologies (NY, USA).

6.3 Obtención de las rebanadas de ovario

Para la perfusión *in vivo*, los ratones fueron anestesiados con xilacina/ketamina 1:25 mg/kg de peso corporal (administrada intraperitonealmente). Se realizó una incisión torácica, a la altura del esternón y se expuso el corazón, se introdujo un catéter a través del ventrículo izquierdo, y por gravedad se perfundió una solución de NaCl al 0.9% (40 mL) para el drenado de la sangre y 100 mL de sacarosa al 10% para la conservación de las estructuras del tejido.

Posteriormente los ovarios fueron disecados y limpiados del tejido circundante e incubados por 24 h en paraformaldehído al 4% (PFA) en solución amortiguadora de fosfatos (PBS: NaCl 136 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, ajustado a pH 7.4 con NaOH), a 4°C para el análisis histológico o incluidos en el medio crioprotector *Tissue-Tek* para los ensayos de inmunofluorescencia. En este caso, el congelamiento de las muestras fue realizado rápidamente por inmersión del bloque en 2-metilbutano y acetona absoluta enfriada en hielo seco. Los bloques fueron almacenados a -70°C. Finalmente se realizaron los cortes de 20 µm de grosor en el criostato (Leica) a una temperatura de -25°C. Las muestras fueron almacenadas a -25°C hasta su uso posterior en los ensayos.

6.4 Histología del ovario de ratón

Los ovarios fueron fijados en PFA al 4% durante 24 h a 4°C, fueron lavados y embebidos por 12 h en una solución de sacarosa al 30%. Luego de un lavado con PBS 1X, fue necesaria la deshidratación del tejido para su inclusión en parafina, por lo que se empleó un tren de alcoholes pasando por el alcohol al 60% (4 h) hasta el xilol (1-2 h). Posteriormente se embebió la muestra por 2 h en parafina a 56°C y finalmente se incluyó en la misma. Los cortes de 8 µm de grosor obtenidos en un microtomo fueron incubados a 38°C durante 12 h y desparafinados con un tren de alcoholes de xilol a alcohol de 60%. Para la tinción con hematoxilina y eosina se llevó a cabo la inmersión de las secciones de tejido en un tren de alcoholes xilol-96%, luego fueron sumergidas en hematoxilina (10 min), solución de Scott (1 min), eosina (30 s) y nuevamente deshidratadas (96%-xilol). Las secciones de ovario fueron montadas con el medio Entellan y analizadas mediante un microscopio de campo claro. El mismo protocolo de tinción fue empleado para analizar los frotis vaginales, los cuales fueron fijados en PFA al 4% durante 20 min a temperatura ambiente.

6.5 Inmunofluorescencia

Para la detección de las distintas proteínas, el protocolo del ensayo de inmunofluorescencia fue el siguiente: las secciones de ovario incluidas en *Tissue-Tek* fueron fijadas durante 25 min en PFA al 4%, neutralizadas con glicina 100 mM durante 45 min a temperatura ambiente y se permeabilizaron con acetona absoluta fría por 5 min. Los cortes fueron lavados con PBS 1X y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con la solución de bloqueo (leche al 5%). La incubación con los anticuerpos primarios (N-caderina 1:200, TROMA-I 1:50 o P2X7 1:200) se realizó a 4°C durante toda la noche. La incubación con el anticuerpo secundario (Alexa Fluor 488 1:100, FITC 1:200 o Cy5 1:200) en PBS-Tween 20 0.05% se llevó a cabo durante 1 h a temperatura ambiente. Para el marcaje de N-caderina y citoqueratina, las muestras fueron tratadas por 20 min con ARNasa (1 µl) y yoduro de propidio (1 µl) para eliminar todo el ARN en la muestra y marcar los núcleos (ADN), respectivamente. Para la detección del

receptor P2X7 el marcaje de los núcleos se realizó con DAPI. Posteriormente para ambos casos, las preparaciones fueron lavadas con PBS 1X y montadas con 20 μ l de *Vectashield*.

De manera particular, para la detección de la N-caderina se empleó el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo conjugado a Alexa Fluor 488, excitado con el láser de argón (488 nm) y cuya emisión es cercana a los 517 nm (señal verde). Para el marcaje de citoqueratina se utilizó un anticuerpo primario de ratón dirigido contra la citoqueratina de ratón (TROMA-I) y el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón conjugado a FITC, que se excita con el láser de argón (488 nm) y su pico de emisión se encuentra en 525 nm (señal verde).

Para el marcaje del receptor P2X7 se empleó el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo conjugado a Cy5, fluorocromo que es excitado con el láser HeNe (633 nm) y cuyo pico de emisión se encuentra en 670 nm (señal roja).

Para el doble marcaje de citoqueratina y P2X7 se emplearon secciones de ovario en parafina, por lo cual se desparafinó el tejido y se rehidrató en un tren de alcoholes (absoluto-50%). Los epítopes fueron expuestos mediante una solución de citrato de sodio durante 20 min en baño maría a 100 °C. Los lavados se realizaron en TBS 1X y el bloqueo con leche al 5% fue de una noche a temperatura ambiente. La mezcla de los anticuerpos primarios, TROMA-I (1:50) y anti-P2X7 (1:200), fue incubada por una noche a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados de 10 min cada uno y se incubó durante 4 h a temperatura ambiente la mezcla de los anticuerpos secundarios, uno acoplado a FITC (1:200) y el otro acoplado a Cy5 (1:200).

Para el marcaje de los núcleos se utilizó el fluorocromo DAPI que es excitado con un láser multifotónico Coherent-XR de longitud de onda de 780 nm o también se empleó el yoduro de propidio excitado con el láser DPSS de longitud de onda de 561 nm.

Para el análisis de los ensayos de inmunofluorescencia se empleó un microscopio confocal Zeiss Axiovert 200 LSM 510 Meta – Multifotónico. Las imágenes fueron capturadas y procesadas mediante el software LSM 510 Meta

(Carl Zeiss, NN, Germany) con el que se realizaron las construcciones de las secciones ópticas (de 3 μm cada una). Las imágenes fueron almacenadas en formato TIFF, color RGB. Para la edición de las imágenes se empleó el programa ImageJ (National Institutes of Health, USA).

6.6 Microinyección en el espacio intrabursal del agonista y del antagonista del receptor P2X7

Con el fin de analizar la expresión del receptor P2X7 y las respuestas celulares que media, se emplearon ratones adultos hembra vírgenes de la cepa C-57, y se llevó a cabo un registro del ciclo estral de los ratones a través del frotis vaginal. Los ratones anestesiados con xilacina/ketamina 1 mg/kg: 25 mg/kg de peso corporal, fueron sometidos a una cirugía de ovario para inyectar entre la bursa y el OSE, el agonista (BzATP 100 μM) y el antagonista (A438079 10 μM) purinérgicos selectivos. Esta prueba se realizó de la siguiente manera: un ovario inyectado con el fármaco y el ovario contralateral inyectado con el vehículo utilizado (PBS 1X). Para el caso del antagonista, éste se aplicó durante 3 min y posteriormente se microinyectó el BzATP. Luego de 12 h de la aplicación de los fármacos se realizó la perfusión *in vivo* de los ratones en estudio para visualizar el efecto. Los animales cuyo frotis vaginal no coincidía con la vascularización y tamaño del útero fueron descartados del estudio con la finalidad de asegurar que los ratones presentaran un ciclo estral regular.

6.7 Detección de la fragmentación del ADN: TUNEL

La técnica de TUNEL, cuyo nombre en inglés hace referencia a la actividad catalítica de la enzima transferasa desoxinucleotidil terminal del ADN (TdT), es un método directo para el estudio de la apoptosis que se basa en la detección de la fragmentación del ADN *in vivo*. Durante la apoptosis la fragmentación del ADN conduce a un aumento en el número de los hidroxilos terminales libres 3' del mismo, y a estos fragmentos de ~180-200 pb (pares de bases) la enzima TdT incorpora grupos dUTP (desoxiuridina trifosfato) marcados, que pueden ser detectados por diferentes métodos. En el presente estudio se utilizó dUTP

acoplado a fluoresceína (FITC). El procedimiento se realizó usando el estuche comercial *Dead End Fluorometric TUNEL System*. El protocolo consistió en fijar las secciones de tejido incluido en *Tissue-Tek* con PFA al 4%, durante un minuto, a temperatura ambiente, después se realizó un lavado de 5 min con PBS 1X y se volvió a fijar con PFA al 4% durante 15 min. Luego de un lavado de 5 min con PBS 1X, se permeabilizó durante 20 min con proteinasa K (20 µg/mL). Posteriormente se incubaron las muestras con la enzima TdT, la mezcla de nucleótidos dUTP-FITC (señal verde) y la solución amortiguadora de equilibrio a 37°C por 60 min. Finalmente la reacción fue detenida e incubada con yoduro de propidio durante 15 min para el marcaje de los núcleos (señal roja). Las muestras fueron montadas con 20 µl de *Vectashield* y analizada a través de microscopía confocal.

6.8 Análisis estadísticos

El nivel de expresión del receptor P2X7 y de muerte celular (fragmentación del ADN) indicado por la emisión de la fluorescencia, fue cuantificado a través del ciclo estral mediante el programa ImageJ (NIH-EUA). Por medio de este programa los canales fueron separados y la señal de fluorescencia de interés fue convertida en una señal gris. Posteriormente, empleando esta señal se seleccionaron al azar las áreas de análisis (seis áreas por imagen) mediante el trazó de círculos en la región de interés y se calculó el promedio de la densidad de píxeles (valor medio gris dada en unidades arbitrarias de fluorescencia) por área (420 píxeles²). El valor medio de gris es la suma de los valores de gris de todos los píxeles de la selección, dividido entre el número de píxeles. Cada valor fue normalizado con el promedio obtenido en el grupo de estro.

Con los datos obtenidos se realizó una comparación entre el nivel de fluorescencia (nivel de expresión del receptor P2X7 o de muerte celular) obtenido para cada grupo bajo estudio, mediante el empleo de un análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías (según los grupos) con medidas repetidas seguido de un prueba *post hoc* de Tukey o Bonferroni. El grado de significancia estadística para las pruebas corresponde a un $\alpha = 0.05, 0.01$ y 0.001 ; el valor de *P* por debajo

de 0.05 se indica con †, $P < 0.01$ § y $P < 0.001$ *** y se consideró como diferencia significativa mostrado en cada gráfica. Todos los datos se muestran como la media \pm error estándar. Las pruebas estadísticas se llevaron a cabo utilizando el paquete GraphPad Prism versión 5.01 (GraphPad software, Inc.).

7. RESULTADOS

7.1 Registro del ciclo estral en ratón

A todos los animales bajo estudio se les realizó un exudado vaginal diario con el fin de analizar la morfología de los tipos celulares obtenidos en las muestras y con ello identificar la fase del ciclo estral en el que fueron sacrificados.

En la **figura 8** se muestran las células de los frotis vaginal que corresponden a cada una de las fases del ciclo estral. La gran cantidad de células anucleadas que se observan en la **figura 8.A** son células escamosas cornificadas del epitelio vaginal que indican la entrada al estro, es decir que los animales han ovulado.

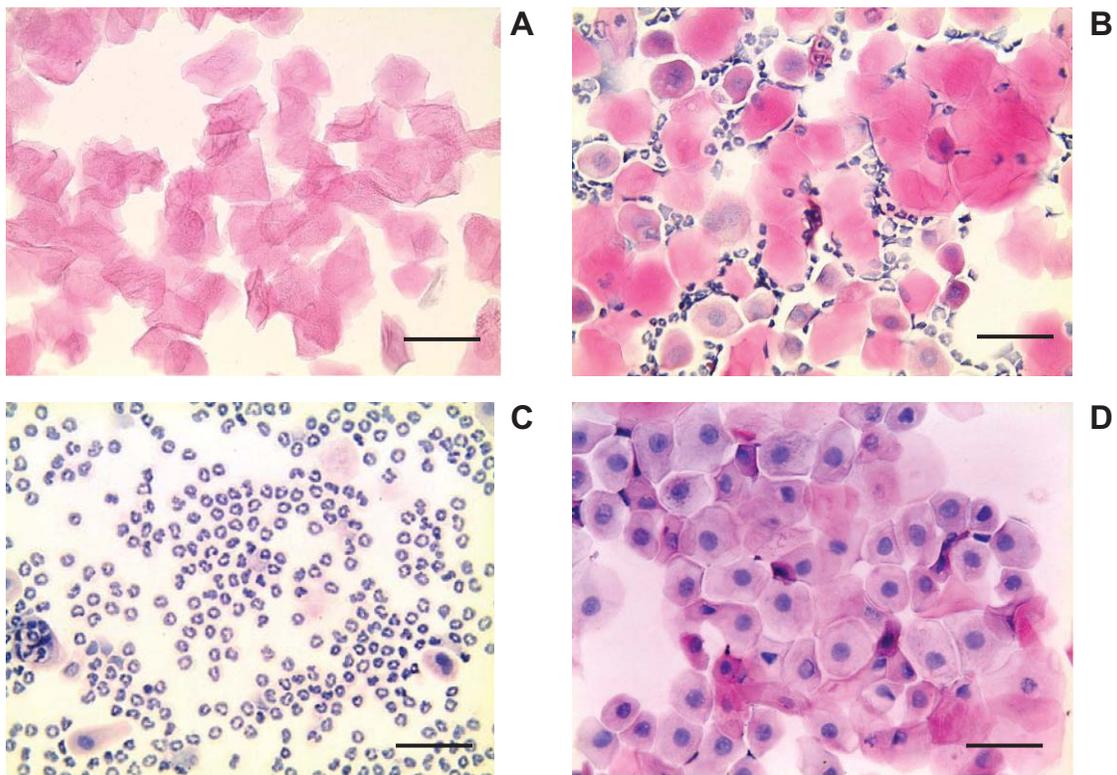


Figura 8. Exudados vaginales obtenidos en cada día del ciclo estral. Las muestras celulares fueron teñidas con hematoxilina y eosina y visualizadas en un microscopio de campo claro con el objetivo 40X. A. Células epiteliales cornificadas características del estro. B. Células epiteliales cornificadas y leucocitos durante el día del metaestro. C. Leucocitos en día del diestro. D. Células epiteliales nucleadas obtenidas durante el día del proestro. Barra de escala 50 µm.

Además del análisis del exudado vaginal, el útero de todos los individuos sacrificados fue examinado con el fin de corroborar la fase del ciclo estral. En el caso del estro, el útero se mostró vascularizado e inflamado.

Durante el día del metaestro se observaron principalmente células cornificadas y leucocitos, pocas células epiteliales nucleadas fueron encontradas (**fig. 8.B**). En el día del diestro se observó un gran número de leucocitos que se tiñeron intensamente con hematoxilina (**fig. 8.C**); en algunas ocasiones encontramos algunas células nucleadas. En la fase del metaestro y diestro el útero se encontró delgado y poco vascularizado.

Las células epiteliales nucleadas que se muestran en la **figura 8.D** indican la entrada al proestro y también se presentan algunas células ya cornificadas. Durante el proestro el útero de los animales en estudio se mostró hinchado por la gran cantidad de líquido que lo llena. Los casos en los que la morfología del útero y el frotis vaginal no coincidían fueron descartados del estudio.

7.2 Análisis histológico del ovario de ratón

Con el fin de identificar anatómicamente el epitelio ovárico superficial en los ovarios de ratonas sin ningún tratamiento, se obtuvieron rebanadas de ovario en parafina de 8 μm , las cuales fueron procesadas como se detalla en la sección de material y métodos.

En la **figura 9.A**, se puede apreciar una sección de ovario completo que muestra bien conservada su estructura y su población de folículos en distintos estadios del crecimiento folicular, desde folículos primordiales (FP) rodeados por una capa de células de la pregranulosa (PG), hasta folículos antrales (FA). Se observan además los distintos tipos celulares que conforman al ovario, las células de la granulosa (G), las células de la teca (T), el estroma ovárico (E), el ovocito (OO) y una monocapa celular puede apreciarse en todo el contorno del ovario. En el aumento mostrado en la **figura 9.B** se observa parte de las células de la teca cuya morfología es aplanada y rodean a un folículo preantral con algunas células de la granulosa subyacentes. Se puede observar también a un lado un folículo antral con varias capas de células de la granulosa y teca.

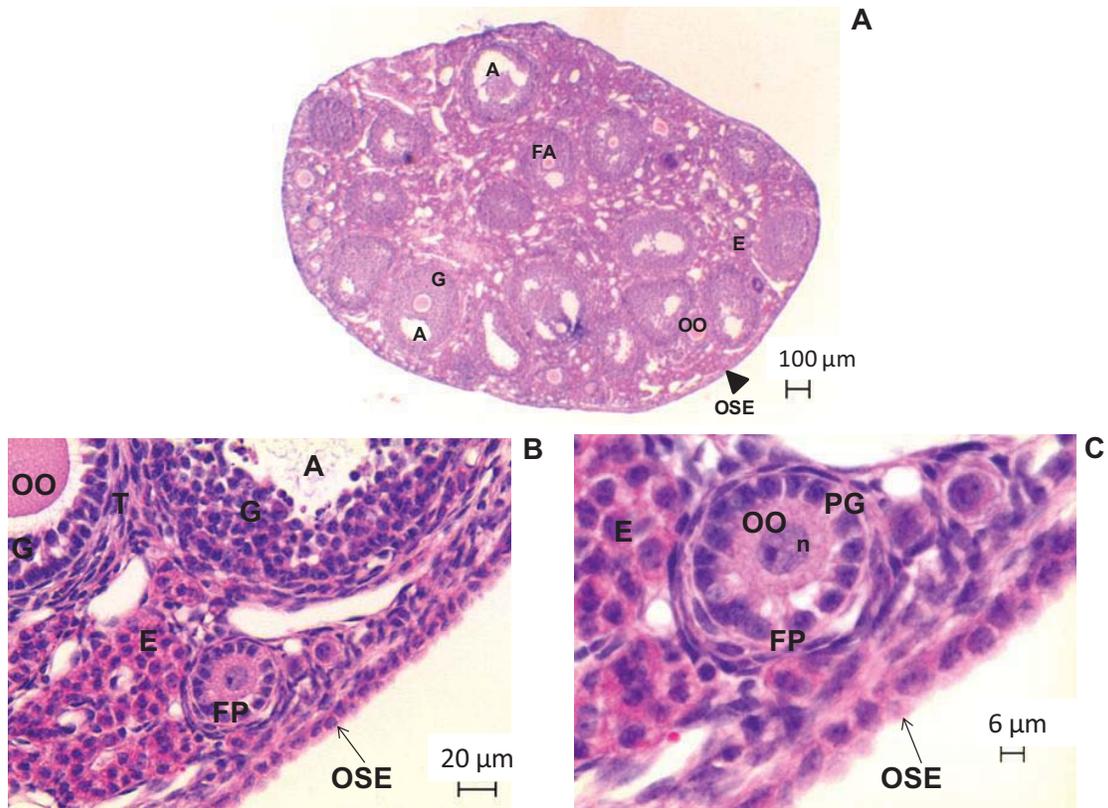


Figura 9. Corte histológico de un ovario de ratón en el día del proestro. Corte de 8 µm de grosor, teñido con hematoxilina y eosina. A. Corte completo del ovario (4X), B. aumento en 40X, y C. aumento en 100X. OO: ovocito, n: núcleo, FP: folículo primario, FA: folículo antral, T: teca, E: estroma, PG: pregranulosa, G: granulosa, A: antro y OSE: epitelio superficial ovárico.

En un acercamiento de esta imagen (**fig. 9.B y 9.C**) se visualiza de manera más clara esta estructura que envuelve al ovario, como una monocapa de células cuboidales; en ningún punto se observan estratificaciones y es claramente identificable. Esta monocapa presenta características morfológicas que coinciden con las que han sido descritas para el OSE (Auersperg et al. 2001), por lo que la técnica empleada hasta ahora ha sido de gran utilidad puesto que nos ha permitido mantener de manera íntegra la capa celular más externa del ovario en estas preparaciones.

7.3 Expresión de los marcadores de epitelio en el OSE de ratón

Con la finalidad de corroborar la identidad de la monocapa de células cuboidales observada en las anteriores preparaciones histológicas, se prosiguió con la detección de los marcadores de epitelio, N-caderina y citoqueratina, cuya expresión en el OSE ha sido bien caracterizada en trabajos anteriores realizados en tejido en humano (Hudson et al., 2008; van Niekerk et al., 1991). Para este fin, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia empleando anticuerpos primarios policlonales dirigidos contra dichos marcadores y un anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo Alexa Fluor 488. Los núcleos en estas preparaciones fueron marcados con yoduro de propidio visualizado en rojo. Las preparaciones fueron analizadas mediante microscopía confocal.

La **figura 10** muestra los resultados obtenidos de dichos ensayos para el marcaje de la N-caderina. En el tratamiento control es decir, sin la incubación del anticuerpo primario (**fig. 10.A**), no fue observado el marcaje para N-caderina en ningún tipo celular. Como se aprecia en la **figura 10.B**, se detectó inmunoreactividad (señal verde) en distintos tipos celulares presentes en el ovario, por ejemplo, las células de la teca y algunas células del estroma, además se observó que la monocapa celular más externa también presentó el marcaje para la N-caderina, sin embargo éste no fue homogéneo.

Un segundo marcador usado fue la citoqueratina, la señal obtenida por el marcado de esta proteína se observó en la capa celular más externa del ovario. La **figura 11.B** muestra la preparación control, que fue incubada únicamente con el anticuerpo secundario, y que mostró ausencia de inmunoreactividad por lo que no hay inespecificidad del anticuerpo secundario. En cambio, la **figura 11.C** muestra la señal específica detectada para esta proteína (señal verde) a un aumento (20X), donde fue posible discernir claramente una monocapa de células altamente inmunoreactivas en la superficie del ovario. En la **figura 11.A** se muestra el mismo marcaje de la **figura 11.C** en una sección casi completa de ovario.

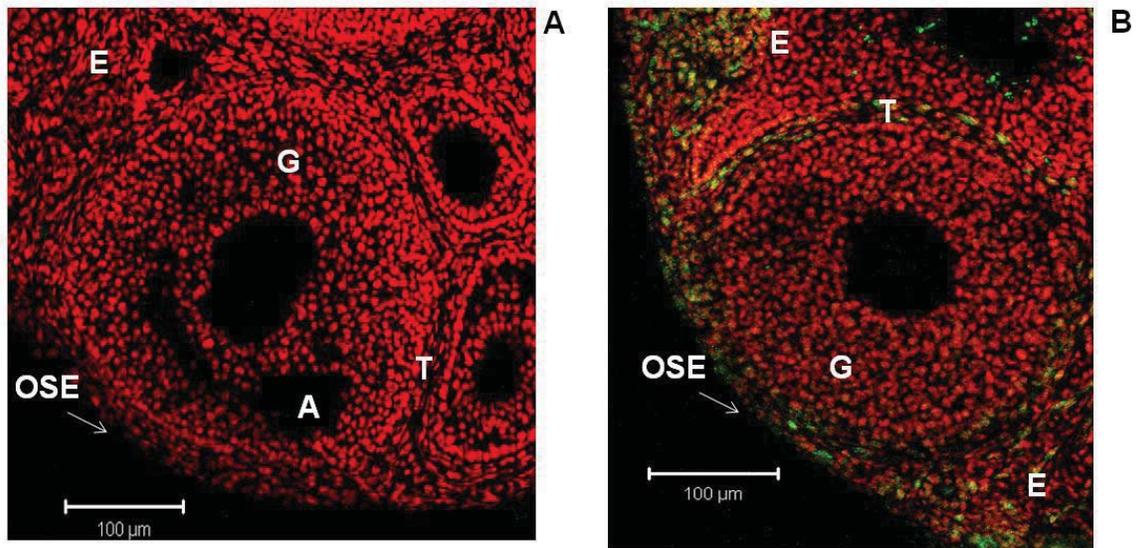


Figura 10. Inmunodetección del marcador de epitelio N-caderina en el OSE de ovario de ratón. A. Control obtenido sin el empleo del anticuerpo primario. B. Marcaje positivo para N-caderina empleando un anticuerpo primario específico. El anticuerpo secundario estaba acoplado a Alexa Fluor 488 (señal verde); los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (señal roja). Imágenes obtenidas con microscopía confocal, aumento 20X. T: teca, E: estroma, G: granulosa, A: antro y OSE: epitelio superficial ovárico.

Dado el marcaje para N-caderina y citoqueratina, podemos concluir que la monocapa celular más externa que se observó en los cortes histológicos de ovario, expresó marcadores de epitelio, característicos de las células del OSE pues se sabe que este epitelio expresa las citoqueratinas 7, 8, 18 y 19 (Auersperg et al., 2001). Por lo que, estos resultados muestran que esta estructura corresponde al epitelio superficial ovárico.

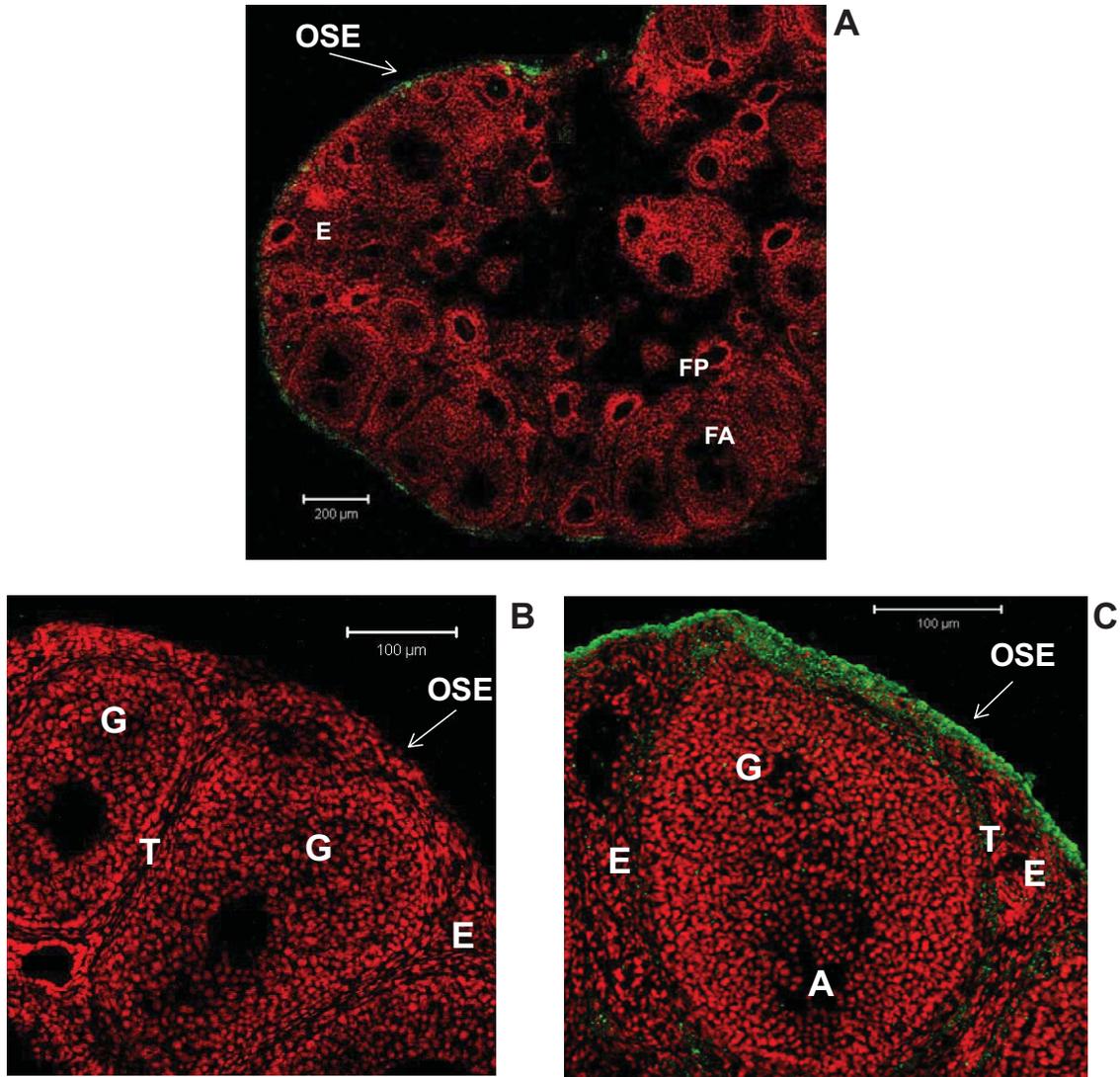


Figura 11. Inmunodetección del marcador de epitelio citoqueratina en el OSE de ovario de ratón. A. Marcaje positivo de las células del OSE para citoqueratina empleando un anticuerpo primario específico, aumento 5X. B. Control obtenido sin el empleo del anticuerpo primario. C. Marcaje positivo de las células del OSE para citoqueratina. El anticuerpo secundario empleado estaba acoplado a Alexa Fluor 488 (señal verde); los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (señal roja). Imágenes obtenidas con microscopía confocal, aumento 20X. T: teca, E: estroma, G: granulosa, A: antro y OSE: epitelio superficial ovárico.

7. 4 Expresión del receptor purinérgico P2X7 en el epitelio superficial ovárico de ratón a través del ciclo estral

Dado que los antecedentes sugieren la expresión de los receptores P2X en los diferentes tipos celulares que conforman el ovario (Juárez, 2006; Vázquez-Cuevas et al. 2006), en el presente trabajo se planteó el objetivo de analizar la expresión del receptor P2X7 en el OSE del ovario de ratón. Una vez identificado el OSE en las secciones de ovario, se prosiguió con la evaluación del receptor P2X7.

Los ensayos de inmunofluorescencia fueron realizados en rebanadas de ovarios obtenidos de ratonas adultas jóvenes en las distintas etapas del ciclo estral y utilizando anticuerpos policlonales dirigidos contra el asa extracelular del receptor P2X7 (señal roja). Para estos ensayos los núcleos fueron marcados con DAPI (señal azul) y los controles (**figuras 12.A, 13.A, 14.A y 15.A**) fueron obtenidos a partir de la incubación con el anticuerpo secundario acoplado a Cy5 en ausencia del anticuerpo primario. El número de ovarios analizados por día del ciclo estral se indican en los textos de figura.

A partir de estos marcajes (**ver figuras 12-15**) determinamos la expresión del receptor en el OSE, en las células de la teca y en los cuerpos lúteos principalmente. La intensidad de fluorescencia (IF) fue cuantificada en cada caso, estos datos fueron normalizados con respecto a la IF en el estro y graficados como se muestra en las **figuras 16 y 17** para cada una de las etapas del ciclo estral. También se observó un nivel bajo de inmunoreactividad en otros tipos celulares como en la pregranulosa y en las células de la granulosa de los folículos preantrales y antrales, respectivamente y en el estroma (**fig. 12-15**). El nivel de fluorescencia para el receptor no fue cuantificado en estas células.

Del análisis resumido en las **figuras 16 y 17** se desprenden las observaciones siguientes:

1) De acuerdo al análisis de Tukey, las células de la teca (**fig. 16.A**) de los folículos antrales en el día del metaestro, presentaron un nivel menor de fluorescencia (0.67 ± 0.05) para el receptor P2X7 comparado con los otros grupos bajo estudio (estro, diestro y proestro). A lo largo del ciclo estral, las células de la

teca antral presentaron un nivel de fluorescencia mayor al detectado en las células del OSE.

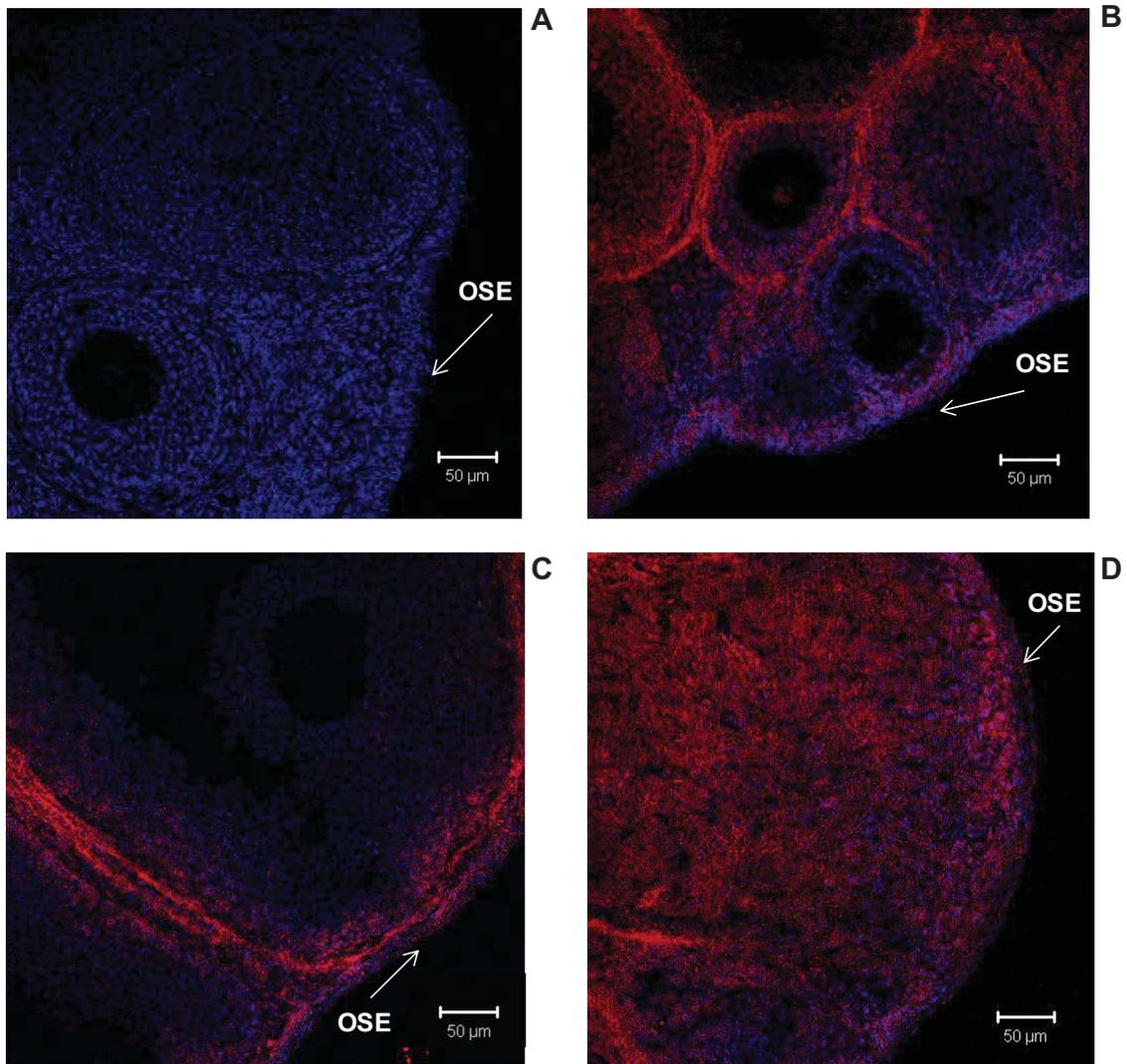


Figura 12. Inmunodetección del receptor purinérgico P2X7 en el OSE de ovario de ratón durante el día del estro. A. Control obtenido con la incubación del anticuerpo secundario. B. Expresión del receptor P2X7 en las células del OSE adyacentes a folículos preantrales, C. a folículos antrales y D. expresión en las células del cuerpo lúteo. Se utilizó un anticuerpo primario dirigido contra el asa extracelular del receptor P2X7, un anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo Cy5 (señal roja) y DAPI para el marcaje de los núcleos (señal azul). Imágenes obtenidas con microscopía confocal, aumento 20X. OSE: epitelio superficial ovárico. n=8 ovarios, 4 animales.

2) El análisis estadístico de los niveles detectados en los cuerpos lúteos a lo largo del ciclo estral (**fig. 16.B**), arrojó diferencias significativas entre el grupo en metaestro y los restantes grupos bajo estudio (estro, diestro y proestro). Durante el metaestro, las células del cuerpo lúteo presentaron un nivel mayor en la señal detectada para el receptor P2X7 (1.5 ± 0.07); esta fase que es posterior a la ovulación, corresponde al inicio del desarrollo de los cuerpos lúteos que mas tarde van a madurar y a degenerar durante el día del diestro, día del ciclo que presentó el menor nivel de fluorescencia (0.68 ± 0.12).

3) Las células del OSE mostraron un nivel menor en la señal detectada para el receptor P2X7 comparado con el nivel encontrado en las células de la teca antral y de los cuerpos lúteos. El OSE próximo a los cuerpos lúteos (**fig. 17.A**) presentó un nivel de fluorescencia menor durante el día del estro; en el resto de los días del ciclo estral el nivel cuantificado fue mayor y no mostró variaciones importantes entre estos grupos.

4) El OSE adyacente a los folículos preantrales (**fig. 17.B**) en el día del metaestro presentó un nivel de fluorescencia menor (0.65 ± 0.07) comparado contra el día del proestro y del estro. Entre los demás grupos de estudio no hubo diferencias estadísticamente significativas.

5) Las células del OSE contiguas a los folículos antrales (**fig. 17.B**) mostraron un nivel menor en la señal fluorescente del receptor P2X7 durante el día del estro, metaestro (1.12 ± 0.06) y del diestro (1.18 ± 0.15) comparada contra el grupo en proestro (2.54 ± 0.08) día en que la señal cuantificada mostró su máximo. Esta etapa del desarrollo folicular representa la fase previa a la ovulación, en donde se observan cambios estructurales indispensables para que este proceso se lleve a cabo durante la mañana del estro.

6) Además de encontrar variaciones a lo largo del ciclo estral, en el nivel de señal para el receptor P2X7, también se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las células del OSE con respecto a la población folicular adyacente. Durante el día del metaestro, el nivel de la señal fue mayor en el OSE inmediato a los folículos antrales comparado a lo observado en el OSE adyacente

a los preantrales (incremento de 72.04%) sin embargo, este aumento fue aún más notable en el proestro (incremento de 158.15%).

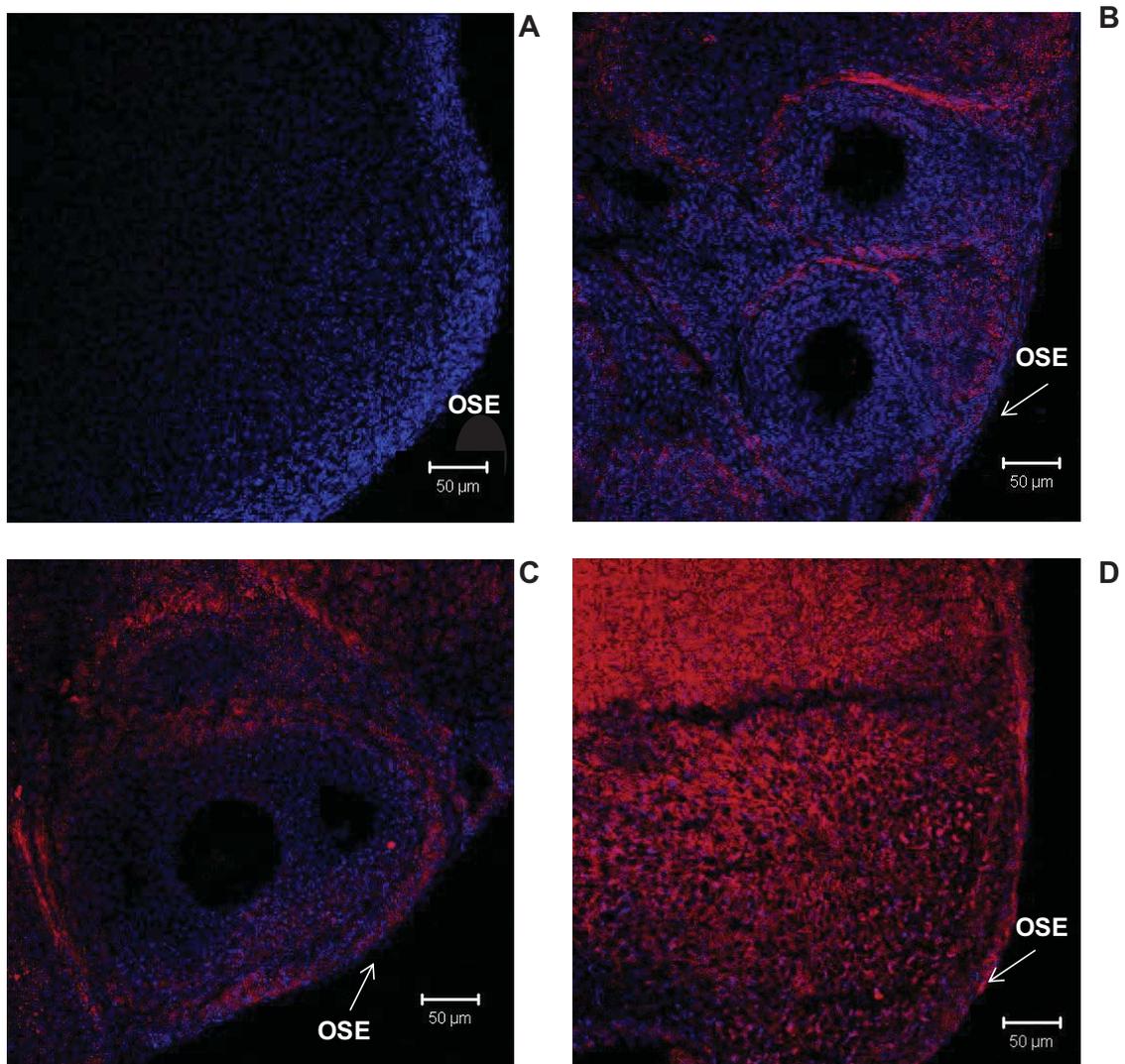


Figura 13. Inmunodetección del receptor purinérgico P2X7 en el OSE de ovario de ratón durante el día del metaestro. A. Control obtenido con la incubación del anticuerpo secundario. B. Expresión del receptor P2X7 en las células del OSE adyacentes a folículos preantrales, C. a folículos antrales y D. expresión en las células del cuerpo lúteo. Se utilizó un anticuerpo primario dirigido contra el asa extracelular del receptor P2X7, un anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo Cy5 (señal roja) y DAPI para el marcaje de los núcleos (señal azul). Imágenes obtenidas con microscopía confocal, aumento 20X. OSE: epitelio superficial ovárico. n=8 ovarios, 4 animales.

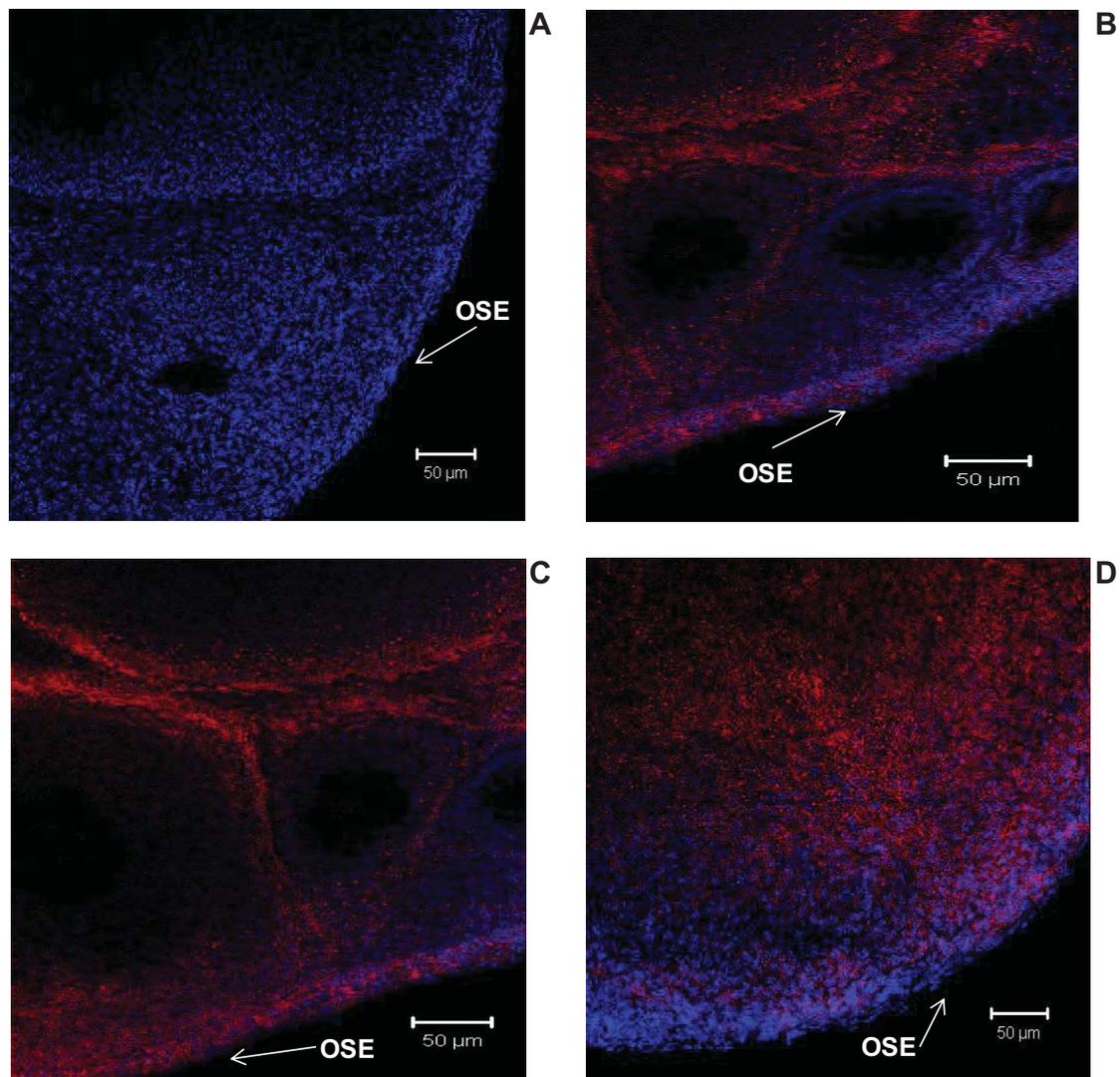


Figura 14. Inmunodetección del receptor purinérgico P2X7 en el OSE de ovario de ratón durante el día del diestro. A. Control obtenido con la incubación del anticuerpo secundario. B. Expresión del receptor P2X7 en las células del OSE adyacentes a folículos preantrales, C. a folículos antrales y D. expresión en las células del cuerpo lúteo. Se utilizó un anticuerpo primario dirigido contra el asa extracelular del receptor P2X7, un anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo Cy5 (señal roja) y DAPI para el marcaje de los núcleos (señal azul). Imágenes obtenidas con microscopía confocal, aumento 20X. OSE: epitelio superficial ovárico. n=8 ovarios, 4 animales.

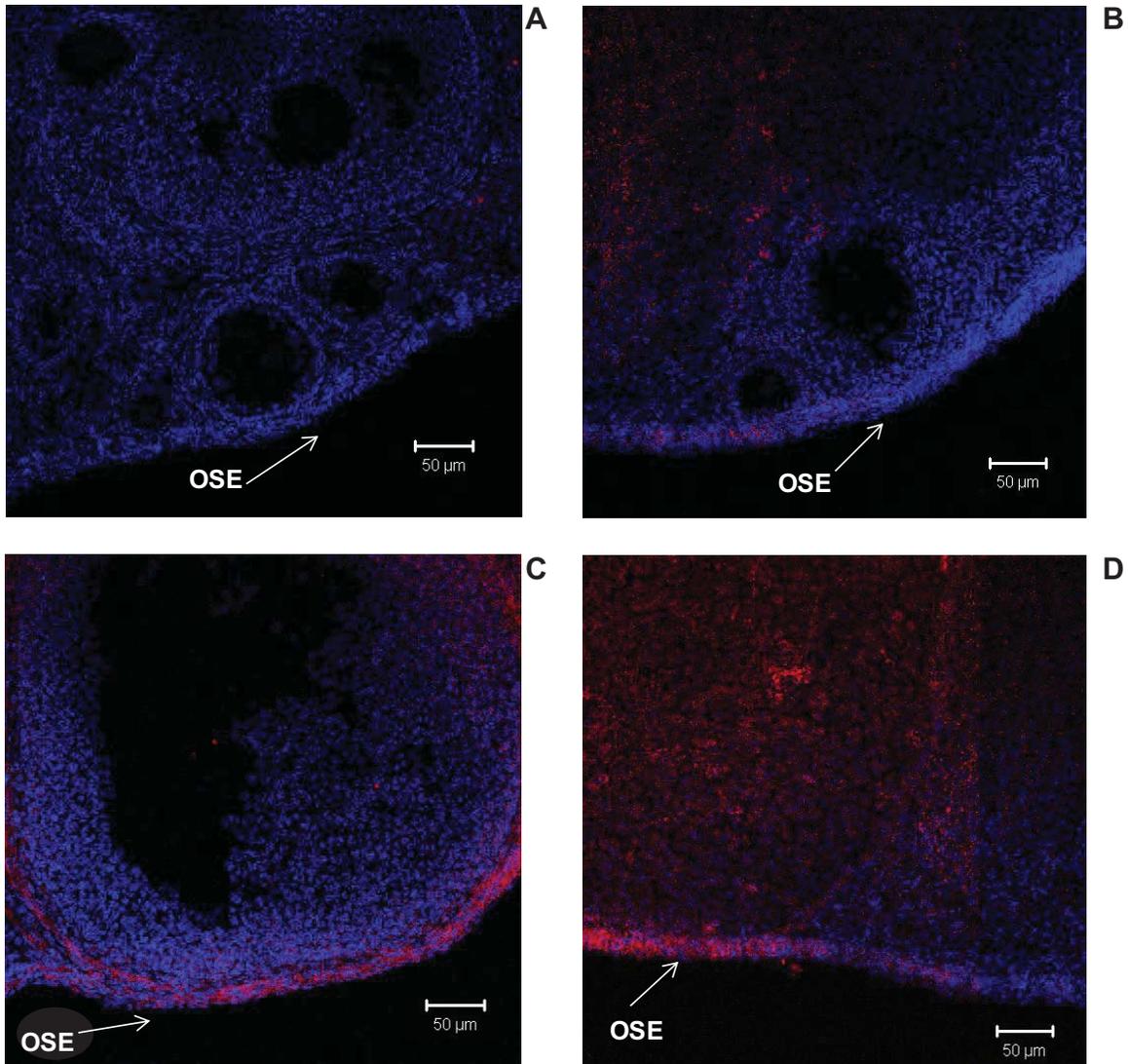


Figura 15. Inmunodetección del receptor purinérgico P2X7 en el OSE de ovario de ratón durante el día del proestro. A. Control obtenido con la incubación del anticuerpo secundario. B. Expresión del receptor P2X7 en las células del OSE adyacentes a folículos preantrales, C. a folículos antrales y D. expresión en las células del cuerpo lúteo. Se utilizó un anticuerpo primario dirigido contra el asa extracelular del receptor P2X7, un anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo Cy5 (señal roja) y DAPI para el marcaje de los núcleos (señal azul). Imágenes obtenidas con microscopía confocal, aumento 20X. OSE: epitelio superficial ovárico. n=10 ovarios, 5 animales.

Del análisis de las imágenes representativas que se muestran en las **figuras 12-15** se desprenden las siguientes observaciones:

1) Durante el día del **estro (fig. 12)**, **metaestro (fig. 13)** y **diestro (fig. 14)**, el nivel en la señal detectada en el OSE adyacente a los folículos preantrales (**fig. 12.B, 13.B y 14.B**) no presentó diferencias comparado con la población de células de OSE adyacentes a los folículos antrales (**fig. 12.C, 13.C y 14.C**). La teca y los cuerpos lúteos (**fig. 12.D, 13.D y 14.D**) presentaron un marcaje más evidente del receptor P2X7 comparado con lo observado en las células del OSE.

2) Durante el día del **proestro (fig. 15)** el marcaje para el receptor resultó ser considerablemente más alto en las células del OSE adyacentes a los folículos antrales (**fig.15.C**) comparado con el OSE inmediato a los folículos inmaduros o preantrales (**fig.15.B**). Durante esta etapa del ciclo, el marcaje en la teca y en los cuerpos lúteos (**fig. 15.D**) también fue muy evidente.

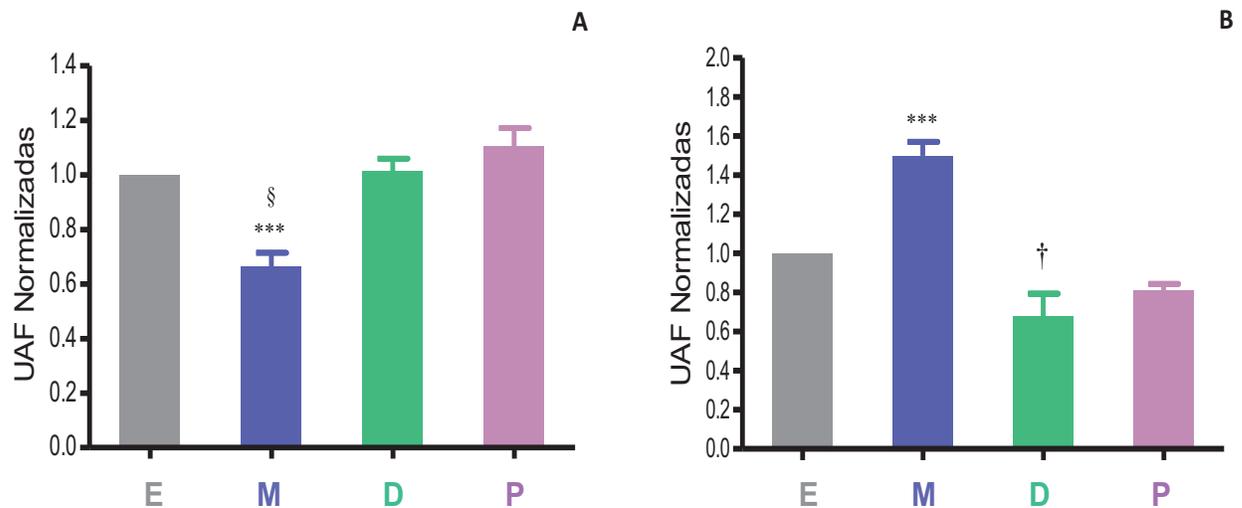


Figura 16. Cuantificación del nivel de fluorescencia detectado para el receptor P2X7 en la teca y los cuerpos lúteos a través del ciclo estral. A. Detección de P2X7 en las células de la teca de los folículos antrales, diferencias significativas entre M vs. E y P ($P < 0.01$ §) y D ($P < 0.001$ ***) y B. Detección de P2X7 en las células de los cuerpos lúteos, diferencias significativas entre M vs. E, D y P ($P < 0.001$ ***) y entre E vs. D ($P < 0.05$ †). IF: intensidad de fluorescencia, E: estro, M: metaestro, D: diestro y P: proestro. n= ~8 ovarios por grupo.

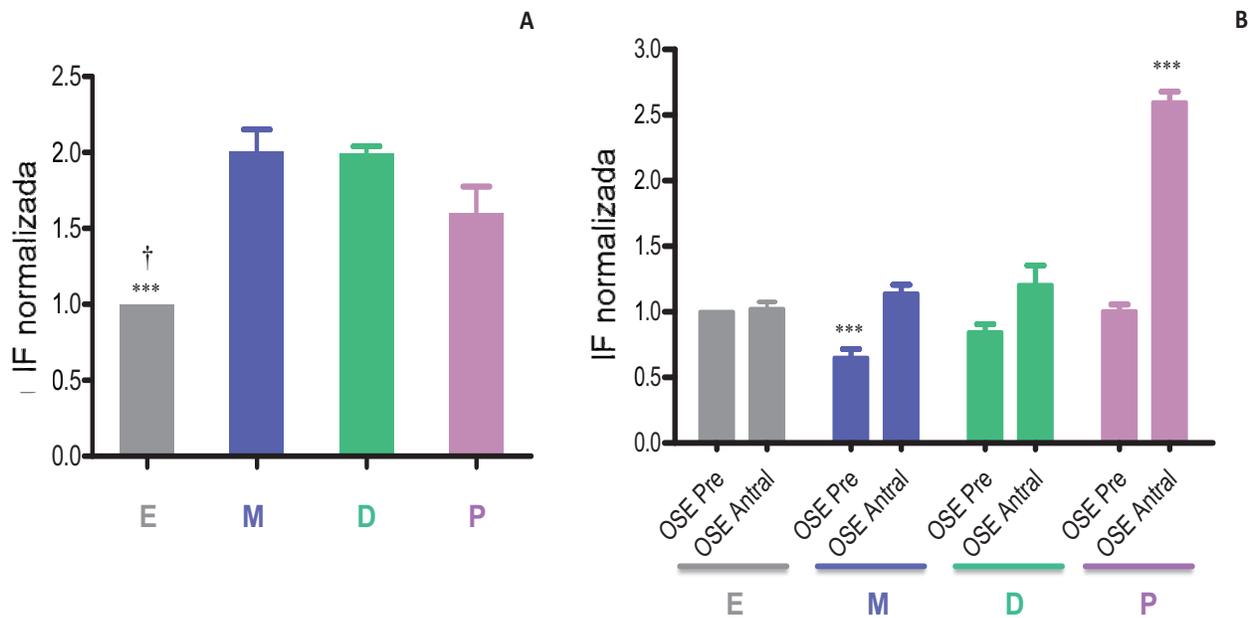


Figura 17. Cuantificación del nivel de fluorescencia detectado para el receptor P2X7 en el OSE a través del ciclo estral. A. Detección en el OSE inmediato a los cuerpos lúteos, diferencias significativas entre E vs. M y D ($P < 0.001$ ***) y P ($P < 0.05$ †). B. Detección en el OSE adyacente a folículos preantrales y a folículos antrales. Existe diferencia significativa en la IF del OSE antral en P vs. todos los grupos de estudio ($P < 0.001$ ***), así como entre el OSE preantral en M vs. OSE preantral en E y en P ($P < 0.001$ ***). IF: intensidad de fluorescencia, OSE antral: OSE adyacente a folículos antrales, OSE Pre: inmediato a folículos preantrales, E: estro, M: metaestro, D: diestro y P: proestro. $n = 8$ ovarios por grupo.

Hasta aquí, los datos obtenidos confirman la expresión del receptor purinérgico P2X7 en el OSE de ovario de ratón así como en otros tipos celulares que conforman al ovario. El receptor muestra un patrón diferencial de expresión en los distintos compartimentos celulares del ovario. Los datos además sugieren que la expresión del receptor P2X7 fue regulada a lo largo del ciclo estral y dependió del contexto celular, ya que la intensidad de la señal fue diferencial entre el OSE adyacente a los folículos preantrales y el OSE que inmediato a los folículos antrales.

7.5 Co-localización del receptor purinérgico P2X7 y la citoqueratina en el epitelio superficial ovárico de ratón

Con el fin de corroborar la identidad de las células marcadas con el anticuerpo anti-P2X7 se realizaron ensayos de co-localización por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos dirigidos contra la citoqueratina y el receptor P2X7. El anticuerpo empleado para marcar a la citoqueratina que es una proteína del citoesqueleto característica del epitelio, fue TROMA-I que detecta una secuencia consenso presente en varias citoqueratinas. Los anticuerpos secundarios utilizados se encuentran acoplados al fluorocromo FITC (señal verde) y Cy5 (señal roja).

El ensayo de la inmunofluorescencia se muestra en la **figura 18** y pone de manifiesto la co-localización de ambas proteínas en el OSE del ovario durante el día del proestro. En la **figura 18** se muestran los canales separados para la citoqueratina (señal verde, **fig. 18.A**), el receptor P2X7 (señal roja, **fig. 18.B**) y el marcaje de los núcleos (señal azul, **fig. 18.C**). En la **figura 18.D** se muestra el empalme de los tres canales y se puede observar la señal de fluorescencia en naranja, lo que indica que ambos anticuerpos marcan el mismo tipo celular, es decir su expresión co-localiza. Por lo que, el marcaje del receptor P2X7 en la monocapa celular externa del ovario indica su expresión específica en el epitelio superficial del ovario.

Dado que la intensidad de la fluorescencia detectada para el receptor fue mayor durante el día del proestro, etapa del ciclo donde las células del OSE tienen que sufrir apoptosis y ser removidas antes de que el ovocito sea ovulado, nos surgieron dos preguntas: 1) ¿La expresión del receptor P2X7 es funcional? Y si fuera funcional 2) ¿Su expresión está relacionada con el ciclo estral? Por ello, nos planteamos el objetivo de evaluar la función del receptor sobre la muerte celular por apoptosis a través del ciclo.

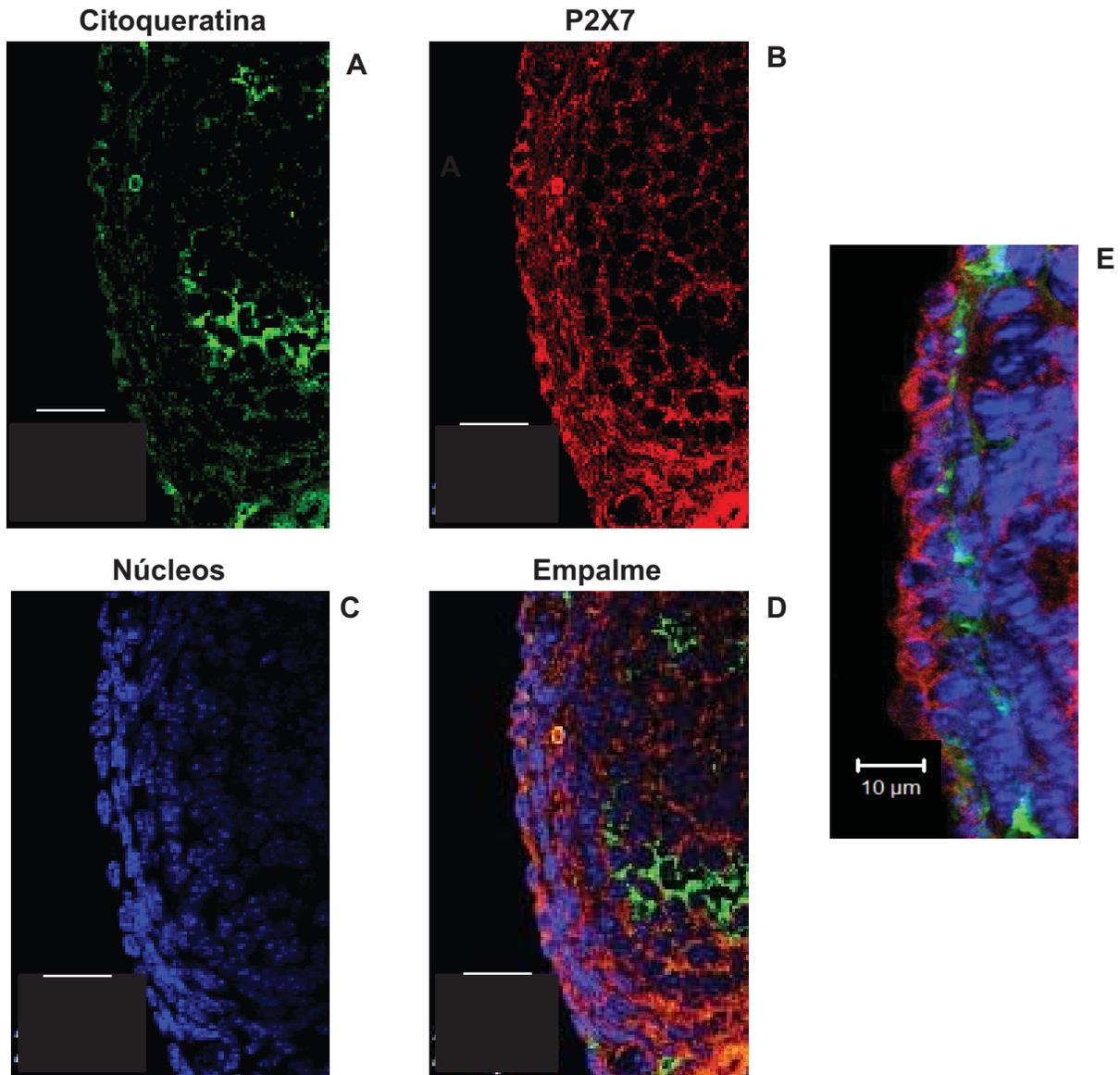


Figura 18. Co-localización del receptor P2X7 y citoqueratina en las células del OSE de ratón en el día del proestro. A. Marcaje para citoqueratina empleando un anticuerpo primario anti-pancitoqueratina y un anticuerpo secundario acoplado a FITC (señal verde). B. Marcaje para el receptor P2X7 empleando un anticuerpo primario dirigido contra el asa extracelular del receptor P2X7 y un anticuerpo secundario acoplado a Cy5 (señal roja). C. Marcaje de los núcleos con DAPI (señal azul). D. Imágenes sobrepuestas de A, B y C que muestra la co-localización del receptor P2X7 y citoqueratina en el OSE del ovario. Barra de escala: 20 μm. Aumento 40X. E. Aumento 80X de la co-localización que se muestra en D.

7.6 Inducción *in vivo* de la apoptosis en el OSE a través del ciclo estral por la activación del receptor P2X7

Los datos mostrados anteriormente indican que el OSE de ratón expresa receptores de tipo P2X7. Con base en dicha evidencia, en este estudio fue evaluada la funcionalidad del receptor *in vivo*, para lo cual se realizaron inyecciones en el espacio intrabursal de BzATP, un agonista específico del receptor P2X7. El BzATP (2 nmol) fue aplicado en las distintas etapas del ciclo estral (estro, metaestro, diestro y proestro), a través de la inyección de 20 µl de solución (PBS 1X) conteniendo el fármaco, en los ovarios de ratonas adultas jóvenes. Como control, el ovario contralateral fue inyectado con el mismo volumen del vehículo. El frotis vaginal se continuó realizando de manera sistemática para evaluar la posible alteración del ciclo estral debida a la manipulación durante la inyección o como efecto de la droga. Los animales inyectados intrabursalmente presentaron continuidad en su ciclo. Tomando en cuenta que la activación de los receptores P2X7 induce muerte celular por apoptosis en distintos sistemas celulares (e.g., Vázquez-Cuevas et al. 2006; Kim et al., 2010), se evaluó de manera particular, la muerte celular apoptótica a través de la técnica de TUNEL a las 24 h de haber realizado la inyección del agonista.

Imágenes típicas de estos análisis se muestran en las **figuras 19 a la 23**. La detección de la apoptosis, en las secciones de ovario, utilizando esta técnica fue evidenciado por la señal verde proveniente de moléculas dUTPs-FITC incorporadas al ADN fragmentado, para contrastar fueron teñidos también los núcleos con yoduro de propidio (señal roja). En general puede observarse que en los ovarios inyectados con BzATP en el día del estro y del metaestro la apoptosis inducida fue de menor intensidad (**ver figura 19 y 20 respectivamente**) comparado con los otros dos grupos de estudio, el diestro y el proestro (**ver figura 21 y 22 respectivamente**); así mismo, en estos dos últimos estadios del ciclo, la apoptosis producida en los ovarios inyectados con BzATP fue mayor a la observada en sus respectivos controles inyectados con el vehículo; el incremento observado en estos grupos fue de un 451.88%.

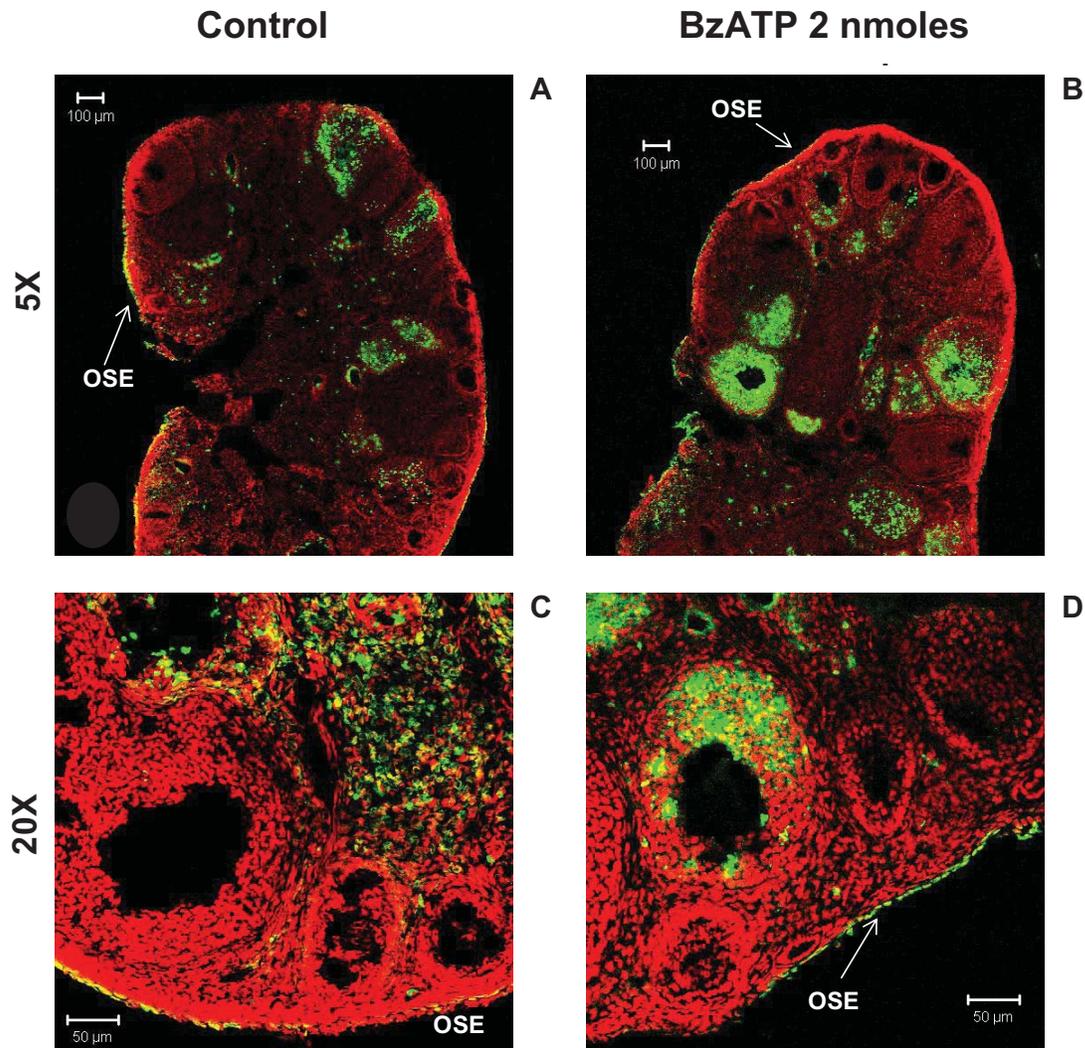


Figura 19. Detección de la apoptosis en el ovario de ratón inyectado con 2 nmol de BzATP en el día del estro. El ensayo de TUNEL muestra el marcaje para los dUTPs-FITC (señal verde) incorporados al ADN fragmentado; los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (señal roja). Se muestran las construcciones de las secciones ópticas obtenidas a través de microscopía confocal con el objetivo 5X (A y B) y 20X (C y D) en el grupo control, inyectado con vehículo (A y C) y en el grupo inyectado con BzATP (B y D). OSE: epitelio superficial ovárico. n= 4 ovarios por grupo, 4 animales.

El aumento de la marca apoptótica es relativamente clara principalmente en dos tipos de estructuras, los cuerpos luteales y en la superficie del ovario, específicamente en la capa celular más externa del ovario, que correspondería al OSE (e.g., **fig. 21-23**). Con estas imágenes fue realizado un análisis de intensidad

de fluorescencia (IF), similar al realizado para la expresión del receptor P2X7, el cual permitió evaluar cuantitativamente la muerte celular en la región del OSE (**fig. 25**) para cada uno de los ovarios en los diferentes estadios del ciclo estral, la IF en cada caso fue también normalizada con respecto a lo observado en la etapa del estro. El análisis estadístico (ver métodos) de estos resultados arrojaron diferencias significativas entre el grupo en el día del proestro y los restantes grupos estudiados. El nivel de muerte celular en las células del OSE durante el día del diestro también fue estadísticamente diferente con respecto al grupo del estro y el metaestro. En cambio, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo en el estro y el metaestro.

Para apoyar la idea de que la inducción de apoptosis en el OSE por la inyección de BzATP fue debida a la activación específica del receptor P2X7, realizamos experimentos similares en los que el agonista fue co-inyectado con A438079 un antagonista específico del receptor (Nelson et al., 2006). Los efectos observados en los ovarios co-inyectados con 0.2 nmol de A438079 y 2 nmol de BzATP en el día del proestro se muestran en la **figura 24**. El análisis estadístico (**fig. 25**) de estos experimentos mostró claras diferencias entre el grupo microinyectado solo con el BzATP y el grupo co-inyectado con el antagonista. Este grupo presentó una disminución del 98% en el nivel de la señal apoptótica comparado con la señal del grupo inyectado solo con BzATP, un resultado que sugiere que la apoptosis generada por la inyección del agonista fue debida principalmente a la activación específica del receptor P2X7. Además, la intensidad de la apoptosis detectada en el OSE cuando fue bloqueado el receptor P2X7 fue significativamente más baja que en el grupo control. Este último resultado sugirió que el receptor P2X7 podría ser responsable de la apoptosis basal que se observa en esta etapa del ciclo.

Todos los controles (inyectados con vehículo) analizados hasta ahora para cada grupo, presentaron un nivel basal de fragmentación del ADN, esto parece corresponder con la muerte celular basal que ha sido reportada anteriormente en el ovario (Slot et al., 2006) y que es el producto de fenómenos como la atresia folicular (Rolaki et al., 2005), la degeneración del cuerpo lúteo (Rolaki et al., 2005)

y el recambio del OSE (Bjersing & Cajander, 1975; Gaytán et al., 2005; Slot et al., 2006).

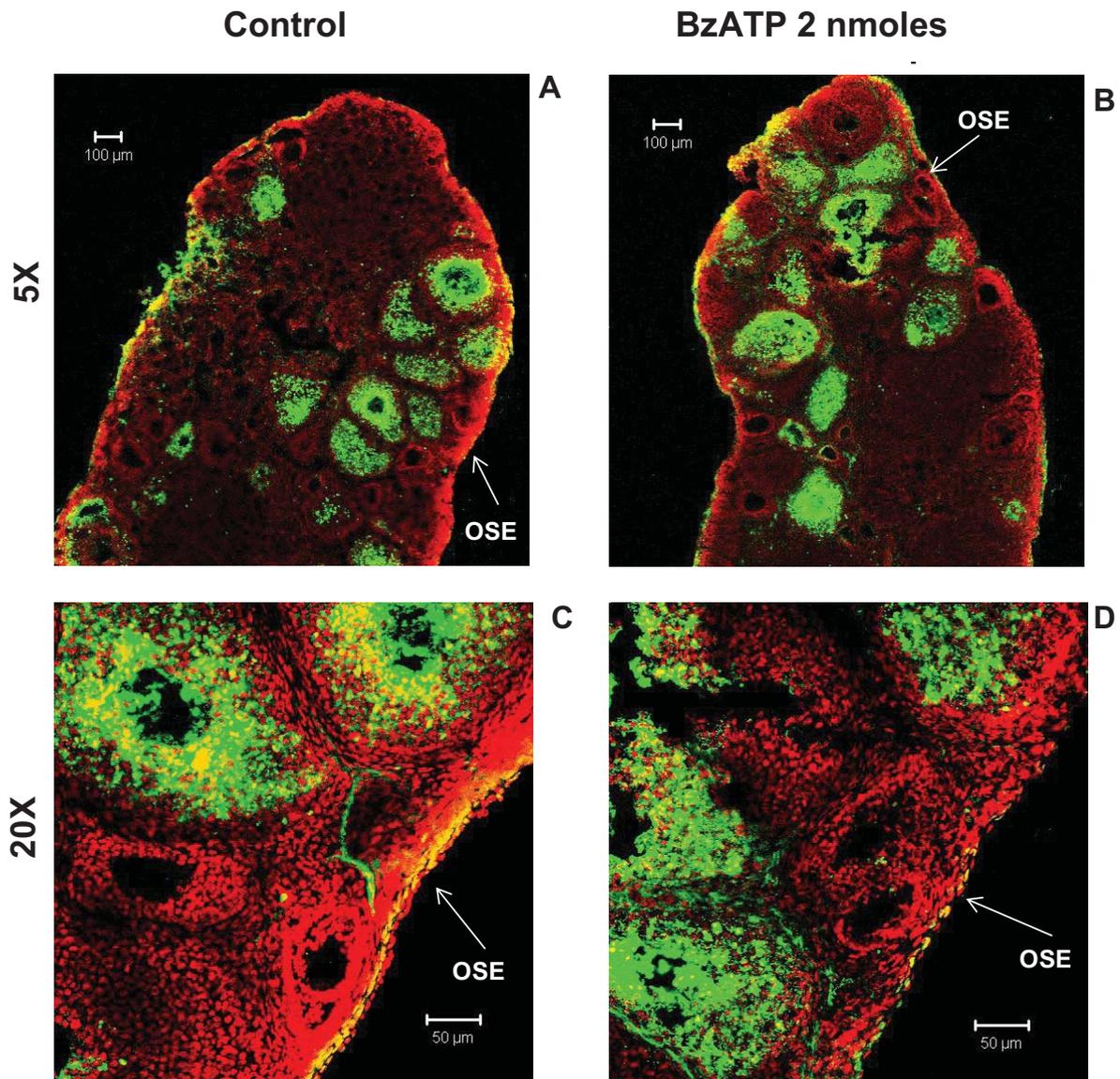


Figura 20. Detección de la apoptosis en el ovario de ratón inyectado con 2 nmol de BzATP en el día del metaestro. El ensayo de TUNEL muestra el marcaje para los dUTPs-FITC (señal verde) incorporados al ADN fragmentado; los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (señal roja). Se muestran las construcciones de las secciones ópticas obtenidas a través de microscopía confocal con el objetivo 5X (A y B) y 20X (C y D) en el grupo control, inyectado con vehículo (A y C) y en el grupo inyectado con BzATP (B y D). OSE: epitelio superficial ovárico. n= 4 ovarios por grupo, 4 animales.

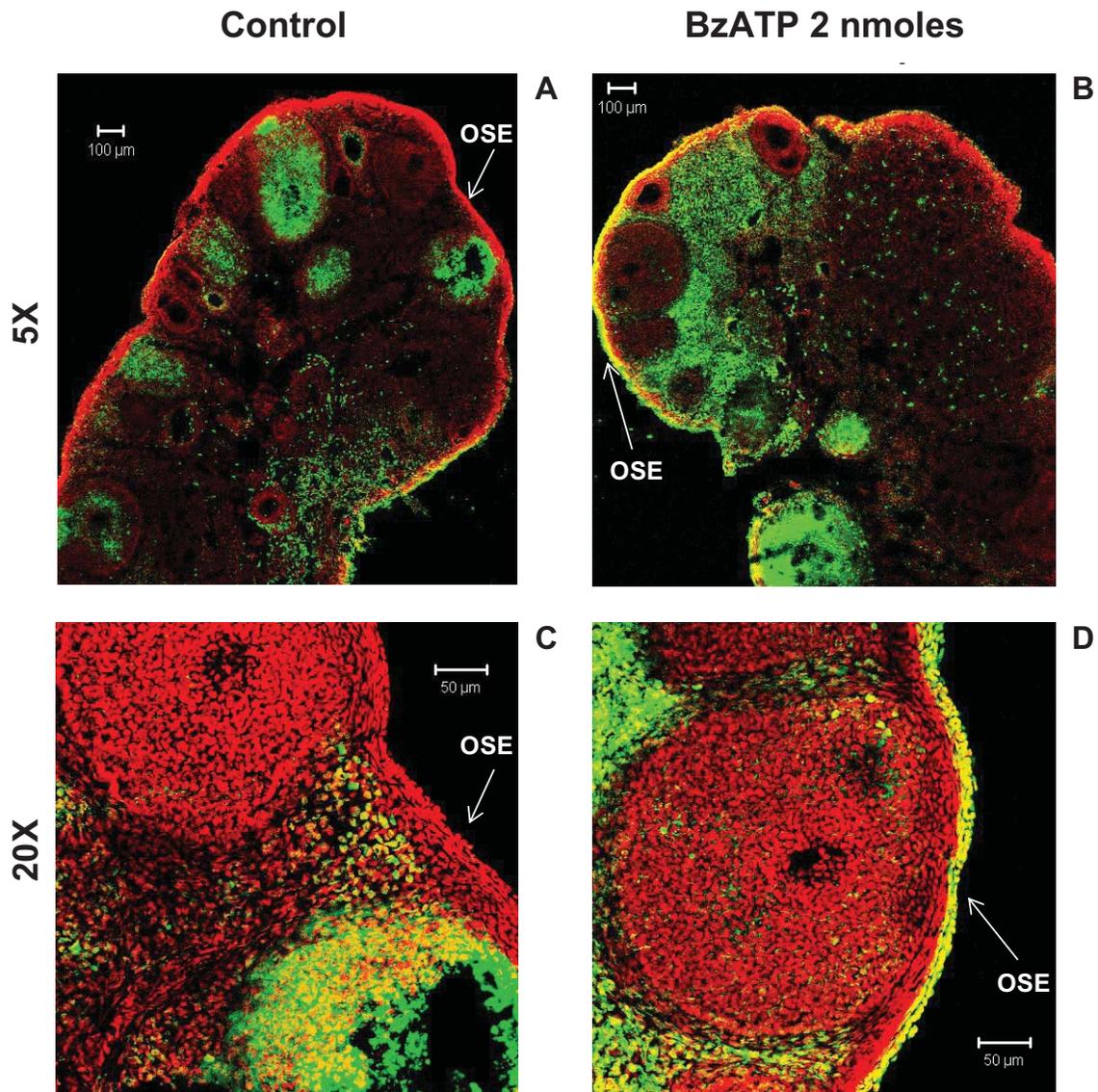


Figura 21. Detección de la apoptosis en el ovario de ratón inyectado con 2 nmol de BzATP en el día del diestro. El ensayo de TUNEL muestra el marcaje para los dUTPs-FITC (señal verde) incorporados al ADN fragmentado; los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (señal roja). Se muestran las construcciones de las secciones ópticas obtenidas a través de microscopía confocal con el objetivo 5X (A y B) y 20X (C y D) en el grupo control, inyectado con vehículo (A y C) y en el grupo inyectado con BzATP (B y D). OSE: epitelio superficial ovárico. n= 4 ovarios por grupo, 4 animales.

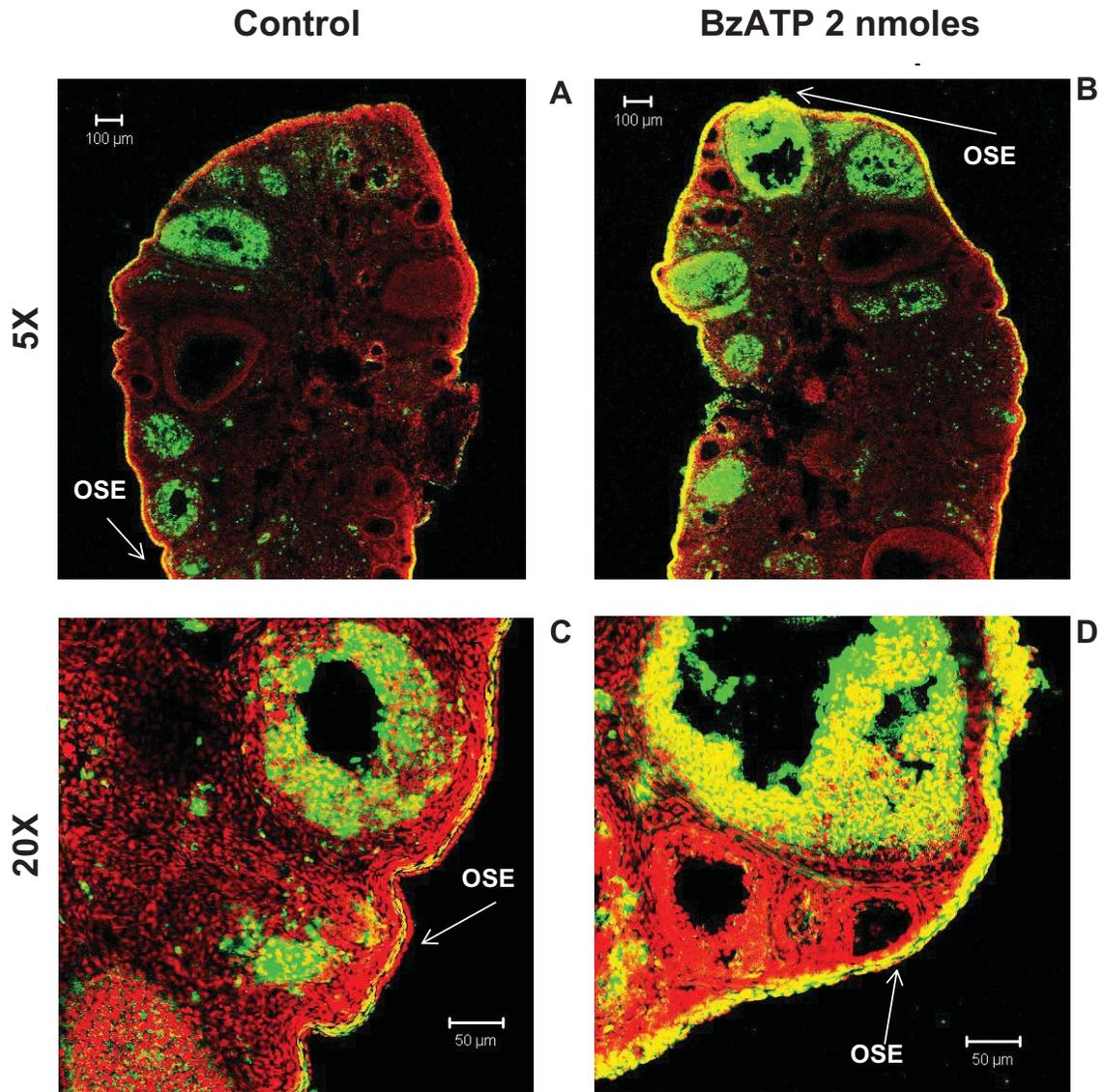


Figura 22. Detección de la apoptosis en el ovario de ratón inyectado con 2 nmol de BzATP en el día del proestro. El ensayo de TUNEL muestra el marcaje para los dUTPs-FITC (señal verde) incorporados al ADN fragmentado; los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (señal roja). Se muestran las construcciones de las secciones ópticas obtenidas a través de microscopía confocal con el objetivo 5X (A y B) y 20X (C y D) en el grupo control, inyectado con vehículo (A y C) y en el grupo inyectado con BzATP (B y D). OSE: epitelio superficial ovárico. n= 4 ovarios por grupo, 4 animales.

BzATP 2 nmoles

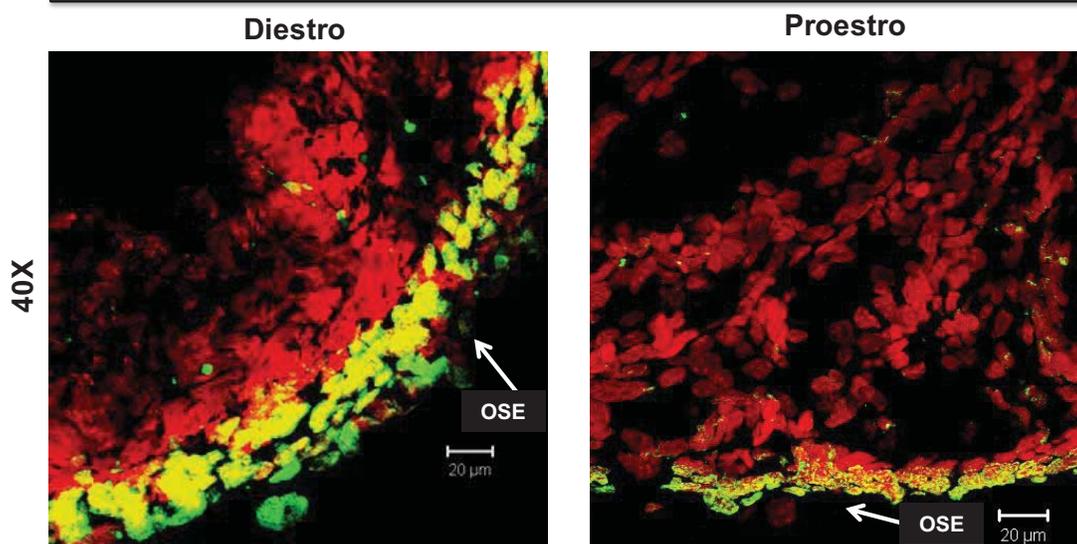


Figura 23. Detección de la apoptosis en el ovario de ratón inyectado con 2 nmol de BzATP en el día del diestro y del proestro. El ensayo de TUNEL muestra el marcaje para los dUTPs-FITC (señal verde) incorporados al ADN fragmentado; los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (señal roja). Acercamiento de las imágenes anteriores obtenidas a través de microscopía confocal con el objetivo 40X. OSE: epitelio superficial ovárico.

Las observaciones durante el día del diestro y el proestro nos sugieren fuertemente la activación específica del P2X7R que se expresa preferencialmente en estas etapas, y que su expresión es funcional *in vivo*.

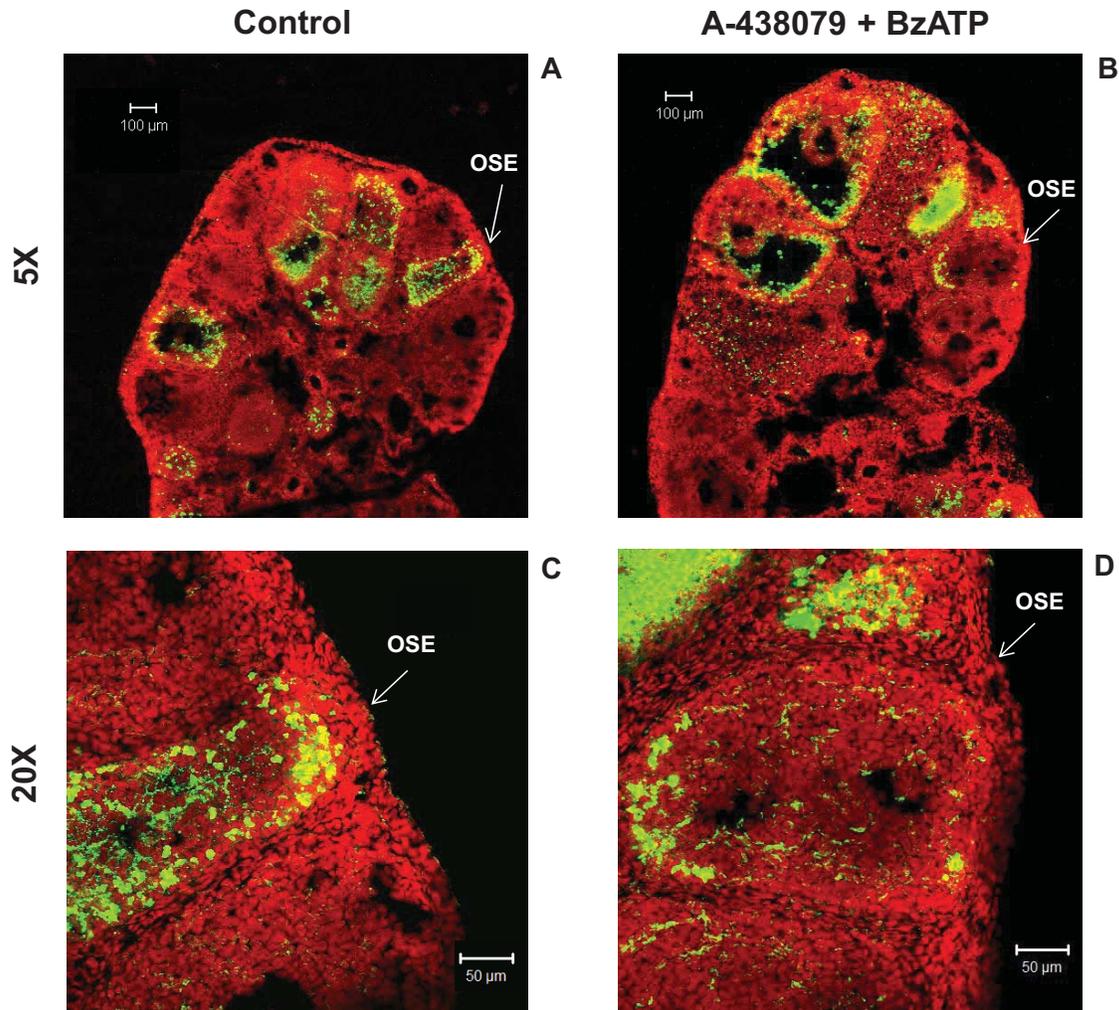


Figura 24. Detección de la apoptosis en el ovario de ratón inyectado con 2 nmol de BzATP y 0.2 nmol de A438079 en el día del proestro. El ensayo de TUNEL muestra el marcaje para los dUTPs-FITC (señal verde) incorporados al ADN fragmentado; los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (señal roja). Se muestran las construcciones de las secciones ópticas obtenidas a través de microscopía confocal con el objetivo 5X (A y B) y 20X (C y D) en el grupo control (A y C) y en el grupo inyectado con los fármacos (B y D). OSE: epitelio superficial ovárico. n= 3 ovarios por grupo, 3 animales.

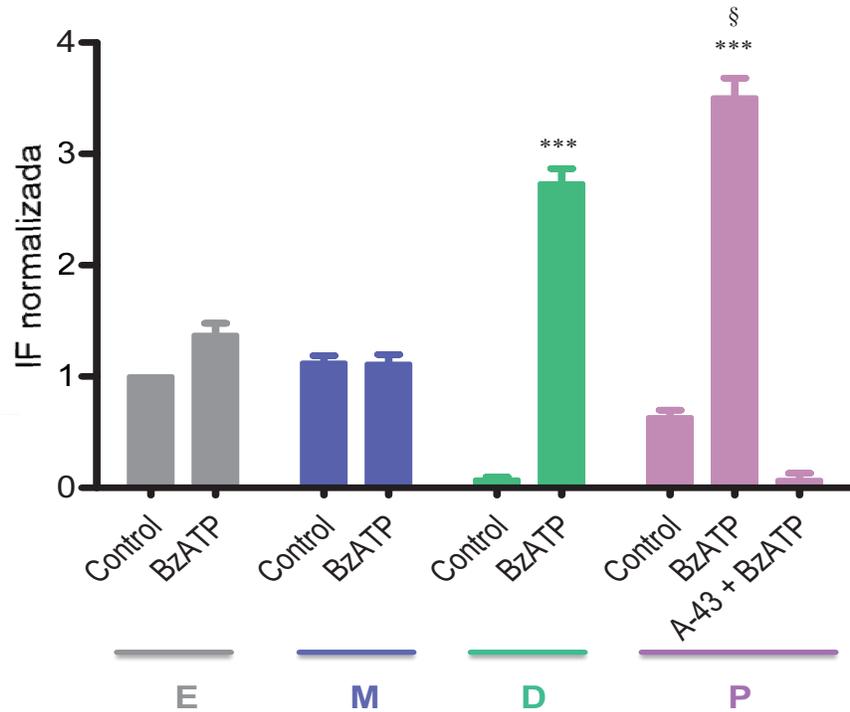


Figura 25. Cuantificación de la muerte celular en el OSE a través del ciclo estral en ratones inyectados con 2 nmol de BzATP y 0.2 nmol de A438079. El BzATP fue microinyectado en cada etapa del ciclo estral y la coinyección de A438079 y BzATP fue realizada durante el día del proestro. Diferencias significativas entre P vs. todos los grupos restantes ($P < 0.001$ ***) y D ($P < 0.01$ §) y entre D vs. todos los grupos restantes ($P < 0.001$ ***). IF: intensidad de fluorescencia, E: estro, M: metaestro, D: diestro y P: proestro. n= 4 ovarios por grupo control y tratado con BzATP, 16 animales.

8. DISCUSIÓN

Mediante ensayos de inmunofluorescencia en el presente estudio se evidenció la expresión del sistema purinérgico *in situ* en el ovario de ratón, de manera particular la expresión del receptor P2X7 en las células de la teca y en los cuerpos lúteos y la expresión funcional en el epitelio superficial ovárico a través del ciclo estral.

El patrón de expresión diferencial del receptor P2X7 en el OSE y en los demás compartimentos celulares del ovario a través del ciclo estral, podría indicar que el sistema purinérgico está influenciado por las concentraciones hormonales de las gonadotropinas y de los esteroides ováricos, al mismo tiempo la mayor expresión observada en el OSE en la vecindad con folículos antrales sugiere además un control ejercido a través de mecanismos locales. Todos estos resultados sugieren también que el receptor P2X7 podría jugar un papel importante sobre la regulación de procesos específicos de la función ovárica.

8.1 ATP como mensajero extracelular en el ovario

El papel que desempeñan la adenosina y sus nucleótidos en los sistemas fisiológicos como moléculas mensajeras ubicuas de acción extracelular (Emmelin y Feldberg, 1948; Holton, 1959; Jarvis y Williams, 2000; Burnstock, 2009) ha sido bien establecida principalmente en el sistema nervioso (Burnstock, 2007). Considerando que: 1) la inervación simpática del ovario influencia el crecimiento folicular y por ende la función ovulatoria (Burden, 1985), 2) que esta influencia está mediada principalmente por noradrenalina (Les Dees et al., 1995) y acetilcolina (Mayerhofer et al., 1998), neurotransmisores que en el sistema nervioso central son co-liberados con ATP (Burnstock, 1976) y, 3) que prácticamente todas las células eucariotas liberan ATP y expresan receptores purinérgicos (Corriden & Insel, 2010), es posible sugerir que el ATP podría actuar como un modulador extracelular en la fisiología del ovario.

8.2 Expresión del sistema purinérgico en el ovario

El papel del ATP en la función ovárica no había sido explorado hasta hace algunos años (e.g., Arellano et al., 1996, 1998). El grupo de Janssens aportó las primeras evidencias sobre la expresión del sistema purinérgico en el ovario de mamífero. Mediante un análisis por Northern blot detectaron el ARNm del receptor P2Y1 en el ovario de humano (Janssens et al., 1996). Para el año 2000 Burnstock et al. realizaron ensayos de inmunohistoquímica para determinar la expresión de receptores P2X en el aparato reproductor femenino de rata. En este estudio, no se encontraron evidencias de la expresión de receptores P2X en los ovarios de ratas sacrificadas durante el día del proestro y estro (Bardini et al., 2000), incluyendo el receptor P2X7 motivo del presente estudio.

Contrario a lo anterior, estudios electrofisiológicos, así como ensayos por RT-PCR, Western-blot e inmunofluorescencia realizados en nuestro laboratorio, han demostrado la expresión de diversos receptores de tipo P2X y P2Y en los distintos compartimentos celulares que conforman el ovario de ratón (Arellano et al., 2002; Morales-Tlalpan et al., 2005; Vázquez-Cuevas et al., 2006; Vázquez-Cuevas et al., 2010; Juárez, 2006). Las células del cumulus expresan funcionalmente receptores P2Y2 (Arellano et al., 2002), las células de la teca de folículos antrales de cerdo y de ratón expresan receptores del tipo P2X7 (Vázquez-Cuevas et al., 2006), la teca de ratón además expresa receptores P2X4, P2Y2 y P2Y6 (Juárez, 2006; Vázquez-Cuevas et al., 2010). Las células de la granulosa de folículos antrales expresan receptores P2X4, P2X7 y P2Y2 (Arellano et al., 2002; Juárez, 2006), mientras que el OSE expresa P2X1, P2X4, P2X7 y P2Y2 (Juárez, 2006). Los resultados obtenidos en este estudio apoyan y complementan la información generada en trabajos previos.

8.3 Expresión del receptor P2X7 en OSE de ratón a través del ciclo estral

En el presente estudio corroboramos la expresión *in situ* del receptor P2X7 en el OSE, teca y células de la granulosa de los folículos preantrales y antrales del ovario de ratón adulto. A diferencia del estudio realizado por Juárez (2006), analizamos la expresión del receptor durante las distintas fases del ciclo estral y

encontramos un nivel de expresión mayor del P2X7 en las células de la teca y el cuerpo lúteo que en el OSE. No habían sido descritas los niveles de expresión del receptor en las distintas etapas del ciclo estral; en el presente trabajo aplicamos métodos de análisis de imágenes para cuantificar el nivel de expresión del receptor y encontramos que aumentaba hasta tres veces en el OSE adyacente a folículos antrales durante el día del proestro y con respecto a la expresión en el OSE inmediato a folículos preantrales, no encontramos variación en el curso del ciclo estral. El OSE mantiene el mismo nivel de expresión del P2X7 a lo largo del ciclo estral y a lo largo del desarrollo folicular, excepto cuando rodea a los folículos antrales durante el día del proestro.

Con respecto a la teca Juárez (2006), encontró una mayor expresión del receptor P2X7 en etapas avanzadas de la foliculogénesis, en el presente estudio no se evaluó el nivel de expresión en las células de la granulosa, ni en la teca de los folículos preantrales, pero sí en la teca de folículos antrales en donde las diferencias a través del ciclo estral no fueron muy marcadas. Por el contrario en el cuerpo lúteo se encontró que durante el día del metaestro había un nivel mayor del receptor, dicha fase corresponde al desarrollo inicial del cuerpo lúteo, que durante el diestro tardío degenerará. Al igual que Juárez (2006), en el ovocito no se detectó la expresión del receptor y en las células de la granulosa se detectó un nivel menor de expresión que no fue cuantificado.

Hasta aquí, los datos obtenidos ponen de manifiesto la expresión del receptor purinérgico P2X7 en el OSE de ovario de ratón. El receptor muestra un patrón diferencial de expresión a través del ciclo estral, lo que sugiere que su nivel de expresión podría estar influenciado por las concentraciones hormonales de las gonadotropinas y/o esteroides ováricos que varían y que determinan dicho ciclo. Una observación importante también es el hecho de que este patrón de expresión en el OSE podría depender no sólo de la fase del ciclo estral (factores sistémicos), sino también de la población folicular adyacente, por lo que la expresión del receptor podría a su vez estar regulado por factores locales que inducen cambios regionalizados en el OSE, este control dependiente del contexto celular ha sido también evocado como importante durante el proceso de ovulación (e.g., Gaytán

et al., 2005), lo cual refuerza la idea de que el receptor P2X7 tiene relevancia en la función ovárica.

8.4 Inducción de la apoptosis en OSE mediante la activación del receptor P2X7 en las distintas fases del ciclo estral

Los resultados obtenidos sobre la inducción de la muerte celular por apoptosis en el OSE de ratón durante el día del diestro y del proestro señalan que la expresión del receptor P2X7 es funcional en el modelo *in situ*. Esto corrobora los resultados anteriormente obtenidos en nuestro laboratorio, en cultivos primarios de OSE en donde la estimulación con BzATP genera un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} dependiente del influjo de Ca^{2+} que no muestra desensibilización y por otro lado, aumenta la permeabilidad en la membrana (a moléculas >700 kDa) por la formación de un megaporo (Vázquez-Cuevas et al., 2012).

El nivel de muerte celular encontrado durante el día del proestro coincide con el nivel de expresión del receptor P2X7 en dicha fase del ciclo estral. Todos los controles analizados, tanto inyectados con vehículo, como ovarios intactos, presentaron un nivel basal de apoptosis, la cual podría corresponder a la muerte celular que ocurre durante la atresia folicular (Slot et al., 2006; Yang et al., 2012), la degeneración del cuerpo lúteo (Guo et al., 1998; Slot et al., 2006) y el recambio del OSE (Gaytán et al., 2005; Slot et al., 2006). No se encontraron diferencias en la apoptosis con respecto a la población de folículos subyacentes al OSE.

Nuestros resultados concuerdan con los estudios de expresión de las proteínas apoptóticas y anti-apoptóticas analizadas en las distintas etapas del ciclo estral (Slot et al., 2006) y en particular, con los estudios realizados en el OSE (Quirk et al., 1997; Slot et al., 2006). En ellos se señala, que proteínas apoptóticas como Fas y la caspasa 3 presentan un nivel de expresión alto alrededor del diestro y bajo durante el metaestro. Durante el proestro, el FasL es abundante en las células del OSE que rodean al folículo preovulatorio (Slot et al., 2006).

Las diferencias en la apoptosis del OSE encontradas a lo largo del ciclo estral, sugiere nuevamente una regulación hormonal, de hecho se sabe que la P4

y E2 modulan la apoptosis en el OSE, sin embargo no se ha estudiado por completo el mecanismo por el cual estas hormonas ejercen influencia sobre la muerte celular *in vivo* (Murdoch y van Kirk 2002; Ho, 2003).

8.5 P2X7 y su relación con el proceso de ovulación

La ovulación ha sido descrita como un proceso de inflamación, en éste ocurre primero la apoptosis de la pared apical del folículo, lo que da lugar a la formación del estigma y posteriormente que ocurra un proceso de necrosis y la subsecuente expulsión del ovocito (Murdoch & McDonnel, 2002). Durante la ovulación el OSE secreta MMP-9 (Rae et al., 2009), expresa además la COX-2 (Papacleovoulou et al., 2011) y diferentes citocinas como la IL-1 (Marth et al., 1996; Papacleovoulou et al., 2011), IL-6, la IL-18 y el TNF- α (Marth et al., 1996). En diversos tipos celulares se ha demostrado la inducción de estos factores mediante la activación del receptor P2X7 (Gu y Wiley, 2006; Yiangou et al., 2006; Wiley et al., 2011), ya que induce la translocación del factor de transcripción NF- κ B al núcleo (Genetos et al., 2011), el cual promueve la transcripción de genes involucrados con la respuesta inflamatoria, como la COX-2 (Barakat et al., 2009) y las diferentes interleucinas (Papacleovoulou et al., 2011).

Se sabe que la IL-18 se expresa en el ovario y que la inyección de un anticuerpo neutralizante reduce significativamente el número de ovocitos liberados en respuesta a la ovulación inducida con gonadotropinas (Tsuji et al., 2001), evidenciando que la IL-18 ejerce un efecto regulatorio sobre la ovulación. Estos datos indican que el receptor P2X7 expresado en el OSE potencialmente podría participar en el proceso ovulatorio, probablemente contribuyendo a la etapas iniciales que involucran inflamación a través de la liberación de la IL-18, entre otros factores.

Con base en esto, podemos sugerir que la estimulación de los receptores P2X7 en el OSE del ovario de ratón podría tener un papel diferencial en la inducción de la apoptosis y/o en la modulación del proceso inflamatorio durante eventos específicos de la fisiología del ovario, como lo es la ovulación. Los resultados obtenidos en el presente trabajo abren una nueva vertiente en el

estudio de los moduladores de la reproducción, enfocando el posible papel de un transmisor con un amplio espectro de acción como lo es el ATP en acciones específicas, las cuales contribuirían a la modulación intraovárica fina de la foliculogénesis.

9. CONCLUSIONES

El epitelio superficial ovárico de ratón expresa receptores P2X7 que son funcionales dado que su estimulación *in situ* fue capaz de inducir apoptosis en este epitelio durante el día del diestro y el proestro.

Los resultados sugieren que la expresión del receptor P2X7 en el OSE de ratón dependió tanto de la población folicular adyacente como del ciclo estral, dado que, el nivel de expresión del receptor fue mayor en las células del OSE cercanas a los folículos antrales durante el día del proestro.

El patrón de expresión del receptor P2X7 en el OSE y los efectos de su activación a través de ciclo estral sugieren que el receptor tiene un papel central en la inducción de la apoptosis durante el proceso de la ovulación.

10. REFERENCIAS

Ahmed CE, Dees WL & Ojeda SR. 1986. The immature rat ovary is innervated by vasoactive intestinal peptide (VIP)-containing fibers and responds to VIP with steroid secretion. *Endocrinology* 118: 1682-9.

Arellano RO, Woodward RM & Miledi R. 1996. Ion channels and membrane receptors in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *Ion Channels* 4: 203-59.

Arellano RO, Garay E & Miledi R. 1998. Cl⁻ currents activated via purinergic receptors in *Xenopus* follicles. *Am J Physiol* 274: C333-40.

Arellano RO, Martínez-Torres A & Garay E. 2002. Ionic currents activated via purinergic receptors in the cumulus cell-enclosed mouse oocyte. *Biol Reprod* 67: 837-46.

Arellano RO, Garay E & Vázquez-Cuevas F. 2009. Functional interaction between native G protein-coupled purinergic receptors in *Xenopus* follicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 16680-5.

Arellano RO, Robles-Martínez L, Serrano-Flores B, Vázquez-Cuevas F & Garay E. 2011. Agonist-activated Ca⁽²⁺⁾ influx and Ca⁽²⁺⁾ -dependent Cl⁽⁻⁾ channels in *Xenopus* ovarian follicular cells: functional heterogeneity within the cell monolayer. *J. Cell. Physiol.* doi: 10.1002/jcp.24046. [Epub ahead of print].

Auersperg N, Maines-Bandiera SL, Dyck HG & Kruk PA. 1994. Characterization of cultured human ovarian surface epithelial cells: phenotypic plasticity and premalignant changes. *Lab Invest* 71: 510–18.

Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK & Leung PC. 2001. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev.* 22:255-88

Auersperg N & Woo MM. 2004. Development and Differentiation of Ovarian Surface Epithelium: Cues for the Basis of its Malignant Potential. *In: Adashi EY y Leung PCK (Ed.). The Ovary.* pp. 579, second edition. Elsevier, New York.

Baird DT & Mitchell A. 2002. Hormonal Control of Folliculogenesis: The Key to Successful Reproduction. *In: Eppig J, Hegele-Hartung C y Lessl M (Ed.).*

The Future of the Oocyte: Basic and Clinical Aspects. pp. 1, first edition. Springer, New York.

Bao L, Locovei S & Dahl G. 2004. Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett* 572: 65-8.

Barakat W, Herrmann O, Baumann B & Schwaninger M. 2009. NF-kappa B induces PGE2-synthesizing enzymes in neurons. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 380: 153-60.

Bardini M, Lee HY & Burnstock G. 2000. Distribution of P2X receptor subtypes in the rat female reproductive tract at late pro-oestrus/early oestrus. *Cell Tissue Res* 299: 105-13.

Becker D, Woltersdorf R, Boldt W, Schmitz S, Braam U, Schmalzing G, & Markwardt FJ. 2008. The P2X7 carboxyl tail is a regulatory module of P2X7 receptor channel activity. *Biol Chem* 283: 25725-34.

Berchuck A, Kohler MF, Boente MP, Rodriguez GC, Whitaker RS & Bast RC Jr. 1993. Growth regulation and transformation of ovarian epithelium. *Cancer* 71: 545-51.

Bodin P & Burnstock G. 2001. Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res* 26: 959-69.

Boucher I, Rich C, Lee A, Marcincin M & Trinkaus-Randall V. 2010. The P2Y2 receptor mediates the epithelial injury response and cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 299: C411-21.

Brannstrom M, Bonello N, Wang LJ & Norman RJ. 1995. Effects of tumor necrosis factor alfa (TNF- α) on ovulation in the rat ovary. *Reprod Fertil Dev* 7: 67-73.

Braw-Tal R & Roth Z. 2005. Gene expression for LH receptor, 17 alpha-hydroxylase and StAR in the theca interna of preantral and early antral follicles in the bovine ovary. *Reproduction* 129: 453-61.

Burden HW. 1985. The Adrenergic Innervation of Mammalian Ovaries. *In*: Ben-Jonathan N, Bahr JM & Weener R. (Ed.). *Catecholamines as Hormone Regulators*. pp. 261, first edition. Raven Press, New York.

Burkhalter RJ, Symowicz J, Hudson LG, Gottardi CJ & Stack M.S. 2011. Integrin regulation of beta-catenin signaling in ovarian carcinoma. *J Biol Chem* 286: 23467-75.

Burnstock G. 1972. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24: 509-81.

Burnstock G. 1976. Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience* 1: 239-48.

Burnstock G. 2007. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 87: 659-797.

Burnstock G. 2009. Purinergic signalling: past, present and future. *Braz J Med Biol Res* 42: 3-8.

Butcher RL, Collins WE & Fugo NW. 1974. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 94: 1704-8.

Cario-Toumaniantz C, Loirand G, Ladoux A. & Pacaud P. 1998. P2X7 receptor activation-induced contraction and lysis in human saphenous vein smooth muscle. *Circ Res* 83: 196-203.

Channing CP, Hillensjo T & Schaerf FW. 1978. Hormonal control of oocyte meiosis, ovulation and luteinization in mammals. *Clin Endocrinol Metab* 7: 601-24.

Chen L, Russell PT & Larsen WJ. 1993. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. *Mol Reprod Dev* 34: 87-93.

Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Zinkernagel A, Nizet V, Insel PA & Junger WG. 2006. ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science* 314: 1792-5.

Choi KC, Tai CJ, Tzeng CR, Auersperg N & Leung PC. 2003. Adenosine triphosphate activates mitogen-activated protein kinase in pre-neoplastic and neoplastic ovarian surface epithelial cells. *Biol Reprod* 68: 309-15.

Chuaire-Noack L, Sánchez-Corredor MG & Ramírez-Clavijo S. 2008. p53 y su papel en el epitelio superficial del ovario. *Invest Clin* 49: 561-93.

Chused TM, Apasov S & Sitkovsky M. 1996. Murine T lymphocytes modulate activity of an ATP-activated P2Z-type purinoceptor during differentiation. *J Immunol* 157: 1371-80.

Cockcroft S & Gomperts BD. 1979. ATP induces nucleotide permeability in rat mast cells. *Nature* 279: 541-2.

Colgin DC & Murdoch WJ. 1997. Evidence for a role of the ovarian surface epithelium in the ovulatory mechanism of the sheep: secretion of urokinase-type plasminogen activator. *Anim Reprod Sci* 47: 197-204.

Collo G, Neidhart S, Kawashima E, Kosco-Vilbois M, North RA & Buell G. 1997. Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 36: 1277-83.

Colomar A & Amédée T. 2001. ATP stimulation of P2X(7) receptors activates three different ionic conductances on cultured mouse Schwann cells. *Eur J Neurosci* 14: 927-36.

Corriden R & Insel PA. 2010. Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation. *Sci Signal* 3:re1.

Costa-Junior HM, Sarmiento-Vieira F & Coutinho-Silva R. 2011. C terminus of the P2X7 receptor: treasure hunting. *Purinergic Signal* 7: 7-19.

Davies BR, Worsley SD & Ponder BA. 1998. Expression of E-cadherin, α -catenin and β -catenin in normal ovarian surface epithelium and epithelial ovarian cancers. *Histopathology* 32: 69–80.

Delgado SM, Escudero CG, Casais M, Gordillo M, Anzulovich AC, Sosa Z & Rastrilla AM. 2010. Ovaric physiology in the first oestral cycle: influence of noradrenergic and cholinergic neural stimuli from coeliac ganglion. *Steroids* 75: 685-94.

Di Virgilio F. 1995. The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol* 16: 524-8.

Di Virgilio F. 2007. Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci* 28: 465-72.

Drury AN & Szent-Györgyi A. 1929. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 68: 213-37.

Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, Park D, Woodson RI, Ostankovich M, Sharma P, Lysiak JJ, Harden TK, Leitinger N & Ravichandran KS. 2009. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 461: 282-6.

Emmelin N & Feldberg W. 1948. Systemic effects of adenosine triphosphate. *Br. J. Pharmacol. Chemother* 3: 273-84.

Erb L, Liao Z, Seye CI & Weisman GA. 2006. P2 receptors: intracellular signaling. *Pflügers Arch* 452: 552-62.

Espey LL & Lipner H. 1994. Ovulation. *In: Knobil E & Neill JD (Ed.). The Physiology of Reproduction.* pp. 725, second edition. Raven Press, New York.

Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Hanau S & Di Virgilio F. 1997a. Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J Exp Med* 185: 579-82.

Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Dal Susino M, Melchiorri L, Baricordi OR & Di Virgilio F. 1997b. Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol* 159: 1451-8.

Fields RD & Burnstock G. 2006. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci* 7: 423-36.

Freeman ME. 1994. The Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. *In: Knobil E & Neill JD (Ed.). The Physiology of Reproduction.* pp. 613, second edition. Raven Press, New York.

Fulda S. 2009. Tumor resistance to apoptosis. *Int J Cancer* 124: 511-5.

Gaytán M, Sánchez MA, Morales C, Bellido C, Millán Y, Martín de Las Mulas J, Sánchez-Criado JE & Gaytán F. 2005. Cyclic changes of the ovarian surface epithelium in the rat. *Reproduction* 129: 311-21.

Genetos DC, Karin NJ, Geist DJ, Donahue HJ & Duncan RL. 2011. Purinergic signaling is required for fluid shear stress-induced NF- κ B translocation in osteoblasts. *Exp Cell Res* 317: 737-44.

George FW & Ojeda SR. 1987. Vasoactive intestinal peptide enhances aromatase activity in the neonatal rat ovary before development of primary follicles or responsiveness to follicle-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5803-7.

Georgiou JG, Skarratt KK, Fuller SJ, Martin CJ, Christopherson RI, Wiley JS & Sluyter R. 2005. Human epidermal and monocyte-derived langerhans cells express functional P2X receptors. *J Invest Dermatol* 125: 482-90.

Gulati R & Peluso JJ. 1997. Opposing actions of hepatocyte growth factor and basic fibroblast growth factor on cell contact, intracellular free calcium levels, and rat ovarian surface epithelial cell viability. *Endocrinology* 138: 1847–56.

Guo K, Wolf V, Dharmarajan AM, Feng Z, Bielke W, Saurer S & Friis R. 1998. Apoptosis-associated gene expression in the corpus luteum of the rat. *Biol Reprod* 58: 739-46.

Hess S, Gulati R & Peluso JJ. 1999. Hepatocyte growth factor induces rat ovarian surface epithelial cell mitosis or apoptosis depending on the presence or absence of an extracellular matrix. *Endocrinology* 140: 2908–16.

Hoffman AG, Burghardt RC, Tilley R & Auersperg N. 1993. An *in vitro* model of ovarian epithelial carcinogenesis: changes in cell-cell communication and adhesion occurring during neoplastic progression. *Int J Cancer* 54: 828–38.

Holton P. 1959. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol* 145: 494-504.

Hsueh AJW, Welsh TH & Jones PBC. 1981. Inhibition of ovarian and testicular steroidogenesis by epidermal growth factor. *Endocrinology* 108: 2002–4.

Hudson LG, Zeineldin R & Stack MS. 2008. Phenotypic plasticity of neoplastic ovarian epithelium: Unique cadherin profiles in tumor progression. *Clin Exp Metastasis* 25: 643-55.

Ilekis JV, Conner JP, Prins GS, Ferrer K, Niederberger C & Scoccia B. 1997. Expression of epidermal growth factor and androgen receptors in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 66: 250–4.

Inoue N, Matsuda F, Goto Y & Manabe N. 2011. Role of cell-death ligand-receptor system of granulosa cells in selective follicular atresia in porcine ovary. *J Reprod Dev* 57: 169-75.

Janssens R, Communi D, Piroton S, Samson M, Parmentier M & Boeynaems JM. 1996. Cloning and tissue distribution of the human P2Y1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 221: 588-93.

Jarvis MF & Williams M. 2000. Purinergic Mechanisms in Nervous System Function and Disease States. *Neuropsychopharmacology*. Available at: <http://www.acnp.org/g4/gn401000063/ch.html>.

Jindal SK, Snoey DM, Lobb DK & Dorrington JH. 1994. Transforming growth factor alpha localization and role in surface epithelium of normal human ovaries and in ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol* 53: 17–23.

Juárez AB. 2006. Expresión de receptores purinérgicos durante la foliculogénesis en mamíferos. Tesis de Maestría en Ciencias (Neurobiología). UNAM.

Kawate T, Michel JC, Birdsong WT & Gouaux E. 2009. Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature* 460: 592-8.

Kim IK. 1995. Apoptosis. *J Korean Med Sci* 10: 307-13.

Kim JE, Ryu HJ, Yeo SI & Kang TC. 2010. P2X7 receptor differentially modulates astroglial apoptosis and caspase activation in the rat brain following status epilepticus. *Hippocampus* 21: 1318-33.

Kim M, Spelta V, Sim J, North RA & Surprenant A. 2001. Differential assembly of rat purinergic P2X7 receptor in immune cells of the brain and periphery. *J Biol Chem* 276: 23262-7.

Kruk PA, Uitto VJ, Firth JD, Dedhar S & Auersperg N. 1994. Reciprocal interactions between human ovarian surface epithelial cells and adjacent extracellular matrix. *Exp Cell Res* 215: 97–108.

Kuroda H, Mandai M, Konishi I, Tsuruta Y, Kusakari T, Kariya M & Fujii S. 2001. Human ovarian surface epithelial (OSE) cells express LH/hCG receptors, and hCG inhibits apoptosis of OSE cells via up-regulation of insulin-like growth factor-1. *Int J Cancer* 91: 309-15.

Lau KM, Mok SC & Ho SM. 1999. Expression of human estrogen receptor-alpha and beta, progesterone receptor, and androgen receptor mRNA in normal and malignant ovarian epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5722-7.

Lawrence IE Jr. & Burden HW. 1980. The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *Anat Rec* 196: 51-9.

Li X, Zhou L, Feng YH, Abdul-Karim FW & Gorodeski GI. 2006. The P2X7 receptor: a novel biomarker of uterine epithelial cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15: 1906-13.

Liu K, Wahlberg P & Ny T. 1998. Coordinated and cell-specific regulation of membrane type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) and its substrate matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) by physiological signals during follicular development and ovulation. *Endocrinology* 139: 4735-8.

MacCalman CD, Farooki R & Blaschuk OW. 1994. Estradiol and progesterone regulate E-cadherin mRNA levels in the mouse uterus. *Endocrine* 2: 485-90.

Malamed S, Gibney JA & Ojeda SR. 1992. Ovarian innervation develops before initiation of folliculogenesis in the rat. *Cell Tissue Res* 270: 87-93.

Marth C, Zeimet AG, Herold M, Brumm C, Windbichler G, Muller-Holzner E, Offner F, Feichtinger H, Zwierzina H & Daxenbichler G. 1996. Different effects of interferons, interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α in normal (OSE) and malignant human ovarian epithelial cells. *Int J Cancer* 67: 826-30.

Meduri G, Vu Hai MT, Jolivet A, Takemori S, Kominami S, Driancourt MA & Milgrom E. 1996. Comparison of cellular distribution of LH receptors and steroidogenic enzymes in the porcine ovary. *J Endocrinol* 148: 435-46.

Mondschein JS & Schomberg DW. 1981. Growth factors modulate gonadotropin receptor induction in granulosa cell cultures. *Science* 211: 1179-80.

Morales-Tlalpan V, Arellano RO & Díaz-Muñoz M. 2005. Interplay between ryanodine and IP3 receptors in ATP-stimulated mouse luteinized-granulosa cells. *Cell Calcium* 37: 203-13.

Murdoch WJ, Colgin DC & Ellis JA. 1997. Role of tumor necrosis factor- α in the ovulatory mechanism of ewes. *J Anim Sci* 75: 1601–5.

Murdoch WJ, Townsend RS & McDonnell AC. 2001. Ovulation-induced DNA damage in ovarian surface epithelial cells of ewes: prospective regulatory mechanisms of repair/survival and apoptosis. *Biol Reprod* 65: 1417-24.

Murdoch WJ & McDonnell AC. 2002. Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis. *Reproduction* 123: 743-50.

Murdoch WJ & Van Kirk EA. 2002. Steroid hormonal regulation of proliferative, p53 tumor suppressor, and apoptotic responses of sheep ovarian surface epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol* 186: 61-7.

Narcisse L, Scemes E, Zhao Y, Lee SC & Brosnan CF. 2005. The cytokine IL-1 β transiently enhances P2X7 receptor expression and function in human astrocytes. *Glia* 49: 245-58.

Negami AI, Sasaki H, Kawakami Y, Kamitani N, Kotsuji F, Tominaga T, & Nakamura T. 1995. Serum human hepatocyte growth factor in human menstrual cycle and pregnancy: a novel serum marker of regeneration and reconstruction of human endometrium. *Horm Res* 44: 42–6.

Nelson DW, Gregg RJ, Kort ME, Perez-Medrano A, Voight EA, Wang Y, Grayson G, Namovic MT, Donnelly-Roberts DL, Niforatos W, Honore P, Jarvis MF, Faltynek CR & Carroll WA. 2006. Structure-activity relationship studies on a series of novel, substituted 1-benzyl-5-phenyltetrazole P2X7 antagonists. *J Med Chem* 49: 3659-66.

Naora H & Montell DJ. 2005. Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms. *Nat Rev Cancer* 5: 355-66.

Osterholzer HO, Johnson JH & Nicosia SV. 1985. An autoradiographic study of rabbit ovarian surface epithelium before and after ovulation. *Biol Reprod* 33: 729-38.

Parr EL. 1975. Rupture of ovarian follicles at ovulation. J Reprod Fertil Suppl 22: 1-22.

Patel P, West-Mays J, Kolb M, Rodrigues JC, Hoff CM & Margetts PJ. 2010. Platelet derived growth factor β and epithelial mesenchymal transition of peritoneal mesothelial cells. Matrix Biol 29: 97-106.

Pelegrin P & Surprenant A. 2006. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor. EMBO J 25: 5071-82.

Pierro E, Nicosia SV, Saunders B, Fultz CB, Nicosia RF & Mancuso S. 1996. Influence of growth factors on proliferation and morphogenesis of rabbit ovarian mesothelial cells *in vitro*. Biol Reprod 54: 660–9.

Pochmann D, Rücker B, Battastini AM & Sarkis JJ. 2004. Ovariectomy and estradiol replacement therapy alters the adenine nucleotide hydrolysis in rat blood serum. Thromb Res 114: 275-81.

Potucek YD, Crain JM & Watters JJ. 2006. Purinergic receptors modulate MAP kinases and transcription factors that control microglial inflammatory gene expression. Neurochem Int 49: 204-14.

Quirk SM, Cowan RG & Huber SH. 1997. Fas antigen-mediated apoptosis of ovarian surface epithelial cells. Endocrinology 138: 4558-66.

Rae MT, Price D, Harlow CR, Critchley HO & Hillier SG. 2009. Glucocorticoid receptor-mediated regulation of MMP9 gene expression in human ovarian surface epithelial cells. Fertil Steril 92: 703-8.

Ralevic V & Burnstock G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacol Rev 50: 413-92.

Rani CS, Salhanick AR & Armstrong DT. 1981. Follicle-stimulating hormone induction of luteinizing hormone receptor in cultured rat granulosa cells: an examination of the need for steroids in the induction process. Endocrinology 108: 1379-85.

Rawson JM & Espey LL. 1977. Concentration of electron dense granules in the rabbit ovarian surface epithelium during ovulation. Biol Reprod 17: 561-6.

Richards JS. 2002. Delivery of the Oocyte from the Follicle to the Oviduct: A Time of Vulnerability. *In*: Eppig J, Hegele-Hartung C & Lessl M (Ed.). The Future of the Oocyte: Basic and Clinical Aspects. pp. 43, first edition. Springer, New York.

Rodríguez GC, Berchuck A, Whitaker RS, Schlossman D, Clarke-Pearson DL & Bast RC Jr. 1991. Epidermal growth factor receptor expression in normal ovarian epithelium and ovarian cancer. II. Relationship between receptor expression and response to epidermal growth factor. *Am J Obstet Gynecol* 164: 745–50.

Rolaki A, Drakakis P, Millingos S, Loutradis D & Makrigiannakis A. 2005. Novel trends in follicular development, atresia and corpus luteum regression: a role for apoptosis. *Reprod Biomed Online* 11: 93-103.

Ryan PL, Valentine AF & Bagnell CA. 1996. Expression of epithelial cadherin in the developing and adult pig ovary. *Biol Reprod* 55: 1091–7.

Sabirov RZ & Okada Y. 2005. ATP release via anion channels. *Purinergic Signal* 1: 311-28.

Sakamaki K, Yoshida H, Nishimura Y, Nishikawa S, Manabe N & Yonehara S. 1997. Involvement of Fas antigen in ovarian follicular atresia and luteolysis. *Mol Reprod Dev* 47: 11-8.

Saldaña C, Vázquez-Cuevas F, Garay E, Arellano RO. 2005. Epithelium and/or theca are required for ATP-elicited K⁺ current in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *J Cell Physiol* 202: 814-21.

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

Sánchez-Torres LE & Diosdado-Vargas F. 2003. Apoptosis: the phenomenon and its determination. *Téc Pecu Méx* 41: 49-62.

Schuetz AW & Lessman C. 1982. Evidence for follicle wall involvement in ovulation and progesterone production by frog (*Rana pipiens*) follicles *in vitro*. *Differentiation* 22: 79-84.

Schulze-Lohoff E, Hugo C, Rost S, Arnold S, Gruber A, Brüne B & Sterzel RB. 1998. Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured mesangial cells via P2Z/P2X7 receptors. *Am J Physiol* 275: F962-71.

Slot KA, Voorendt M, de Boer-Brouwer M, van Vugt HH & Teerds KJ. 2006. Estrous cycle dependent changes in expression and distribution of Fas, Fas ligand, Bcl-2, Bax, and pro- and active caspase-3 in the rat ovary. *J Endocrinol* 188: 179-92.

Sluyter R, Shemon AN, Barden JA & Wiley JS. 2004. Extracellular ATP increases cation fluxes in human erythrocytes by activation of the P2X7 receptor. *J Biol Chem* 279: 44749-55.

Spaniel-Borowski K. 2011. Ovulation as danger signaling event of innate immunity. *Mol Cell Endocrinol* 333: 1-7.

Su C, Bevan JA & Burnstock G. 1971. [³H]adenosine triphosphate: release during stimulation of enteric nerves. *Science* 173: 336-8.

Sundfeldt K, Piontkewitz Y, Ivarsson K, Nilsson O, Hellberg P, Brannstrom M, Janson P-O, Enerback S & Hedin L. 1997. E-cadherin expression in human epithelial ovarian cancer and the normal ovary. *Int J Cancer* 74: 275–80.

Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA & Buell G. 1996. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272: 735-8.

Tadakuma H, Okamura H, Kitaoka M, Iyama K. & Usuku G. 1993. Association of immunolocalization of matrix metalloproteinase 1 with ovulation in hCG-treated rabbit ovary. *J Reprod Fertil* 98: 503-8.

Tai CJ, Kang SK, Choi KC, Tzeng CR & Leung PC. 2001. Antigonadotropic action of adenosine triphosphate in human granulosa-luteal cells: involvement of protein kinase C alpha. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 3237-42.

Terranova PF & Montgomery RV. 1997. Review: cytokine involvement in ovarian processes. *Am J Reprod Immunol* 37: 50–63.

Tilly JL, Pru JK & Rueda BR. 2004. Apoptosis in Ovarian Development, Function, and Failure. *In: Adashi EY & Leung PCK (Eds.). The Ovary.* pp. 321, second edition. Elsevier, New York.

Torres GE, Egan TM & Voigt MM. 1999. Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem* 274: 6653-9.

Tu MT, Luo SF, Wang CC, Chien CS, Chiu CT, Lin CC & Yang CM. 2000. P2Y(2) receptor-mediated proliferation of C(6) glioma cells via activation of Ras/Raf/MEK/MAPK pathway. *Br J Pharmacol* 129: 1481-9.

Vanderhyden B. 2002. Molecular basis of ovarian development and function. *Frontier Bioscience* 7: d2006-22.

Vanderhyden BC, Shaw TJ, Garson K & Tonary AM. 2004. Ovarian Carcinogenesis. *In: Adashi EY & Leung PCK (Eds.). The Ovary.* pp. 113, second edition. Elsevier, New York.

van Niekerk CC, Boerman OC, Ramaekers FC & Poels LG. 1991. Marker profile of different phases in the transition of normal human ovarian epithelium to ovarian carcinomas. *Am J Pathol* 138: 455-63.

Vázquez-Cuevas FG, Juárez B, Garay E & Arellano RO. 2006. ATP-induced apoptotic cell death in porcine ovarian theca cells through P2X7 receptor activation. *Mol Reprod Dev* 73: 745-55.

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

Vázquez-Cuevas FG, Garay E, Martínez-Ramírez AS, Cruz-Rico A, García-Carrancá A, Pérez-Montiel D, Juárez B & Arellano RO. 2012. Functional expression of P2X7 receptors in ovarian surface epithelium from mouse and human. *Enviado.*

Velázquez JA & Mendieta E. 2005. Factores que regulan el desarrollo folicular II: Folículos antrales. *Encuentros en la Biología* 101: 1136-8.

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

Wang ZY, 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. *Int J Cancer* 98: 873-8.

Wang J, Lin L, Parkash V, Schwartz PE, Lauchlan SC & Zheng W. 2003. Quantitative analysis of follicle-stimulating hormone receptor in ovarian epithelial tumors: a novel approach to explain the field effect of ovarian cancer development in secondary mullerian systems. *Int J Cancer* 103: 328-34.

Wareham K, Vial C, Wykes RC, Bradding P & Seward EP. 2009. Functional evidence for the expression of P2X1, P2X4 and P2X7 receptors in human lung mast cells. *Br J Pharmacol* 157: 1215-24.

Westfall DP, Todorov LD & Mihaylova-Todorova ST. 2002. ATP as a cotransmitter in sympathetic nerves and its inactivation by releasable enzymes. *J Pharmacol Exp Ther* 303: 439-44.

Wong AS & Leung PC. 2007. Role of endocrine and growth factors on the ovarian surface epithelium. *J Obstet Gynaecol Res* 33: 3-16.

Wibrand F, Honoré E & Lazdunski M. 1992. Opening of glibenclamide-sensitive K⁺ channels in follicular cells promotes *Xenopus* oocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5133-7.

Wright JW, Pejovic T, Lawson M, Jurevic L, Hobbs T & Stouffer RL. 2010. Ovulation in the absence of the ovarian surface epithelium in the primate. *Biol Reprod* 82: 599-605.

Wright JW, Pejovic T, Jurevic L, Bishop CV, Hobbs T & Stouffer RL. 2011. Ovarian surface epitheliectomy in the non-human primate: continued cyclic ovarian function and limited epithelial replacement. *Hum Reprod* 26: 1422-30.

Xie G, Yao Q, Liu Y, Du S, Liu A, Guo Z, Sun A, Ruan J, Chen L, Ye C & Yuan Y. 2012. IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition promotes the generation of breast cancer stem-like cells analogous to mammosphere cultures. *Int J Oncol* 40: 1171-9.

Yang R, Xu S, Zhao Z & Li J. 2012. Fas ligand expression and mediated activation of an apoptosis program in bovine follicular granulosa cells. *Gene* 493: 148-54.

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: 5497-505.

Ziltener HJ, Maines-Bandiera S, Schrader JW & Auersperg N. 1993. Secretion of bioactive interleukin-1, interleukin-6, and colony-stimulating factors by human ovarian surface epithelium. *Biol Reprod* 49: 635–641.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la estructura del ovario de humano adulto.....	2
Figura 2. Corte histológico de un ovario ovino.....	3
Figura 3. Niveles hormonales en el ciclo estral de la rata.....	6
Figura 4. Degeneración tisular durante la ovulación en mamíferos.....	11
Figura 5. Mecanismos de liberación del ATP y la comunicación autocrina y paracrina.....	15
Figura 6. Familia de receptores purinérgicos activados por los nucleótidos de adenosina.	16
Figura 7. Estructura de los receptores P2X.....	19
Figura 8. Exudados vaginales obtenidos en cada día del ciclo estral.....	37
Figura 9. Corte histológico de un ovario de ratón en el día del proestro.....	39
Figura 10. Inmunodetección del marcador de epitelio N-caderina en el OSE de ovario de ratón.....	41
Figura 11. Inmunodetección del marcador de epitelio citoqueratina en el OSE de ovario de ratón.....	42
Figura 12. Inmunodetección del receptor purinérgico P2X7 en el OSE de ovario de ratón durante el día del estro.....	44
Figura 13. Inmunodetección del receptor purinérgico P2X7 en el OSE de ovario de ratón durante el día del metaestro.....	46
Figura 14. Inmunodetección del receptor purinérgico P2X7 en el OSE de ovario de ratón durante el día del diestro.....	47
Figura 15. Inmunodetección del receptor purinérgico P2X7 en el OSE de ovario de ratón durante el día del proestro.....	48
Figura 16. Cuantificación del nivel de fluorescencia detectado para el receptor P2X7 en la teca y los cuerpos lúteos a través del ciclo estral	49
Figura 17. Cuantificación del nivel de fluorescencia detectado para el receptor P2X7 en el OSE a través del ciclo estral.....	50

Figura 18. Co-localización del receptor P2X7 y citoqueratina en las células del OSE de ratón en el día del proestro.....	52
Figura 19. Detección de la apoptosis en el ovario de ratón inyectado con 2 nmol de BzATP en el día del estro.....	55
Figura 20. Detección de la apoptosis en el ovario de ratón inyectado con 2 nmol de BzATP en el día del metaestro.....	56
Figura 21. Detección de la apoptosis en el ovario de ratón inyectado con 2 nmol de BzATP en el día del diestro	57
Figura 22. Detección de la apoptosis en el ovario de ratón inyectado con BzATP 2 nmol en el día del proestro.....	58
Figura 23. Detección de la apoptosis en el ovario de ratón inyectado con 2 nmol de BzATP en el día del diestro y del proestro. Aumento 40X.....	59
Figura 24. Detección de la apoptosis en el ovario de ratón inyectado con 2 nmol de BzATP y 0.2 nmol de A438079 en el día del proestro.....	60
Figura 25. Cuantificación de la muerte celular en el OSE a través del ciclo estral en ratones inyectados con 2 nmol de BzATP y 0.2 nmol de A438079.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

A438079: Clorhidrato de 3-[[5-(2,3-diclorofenil)-1H-tetrazol-1-il] metil] piridina

AC: Adenilato Ciclasa

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

Ado: Adenosina

ADP: Difosfato de Adenosina

AH: Ácido Hialurónico

AMP: Monofosfato de adenosina

AMPc: AMP cíclico

APt: Plasminógeno de Tejidos

APu: Plasminógeno Urocinasa

ARNasa: Ribonucleasa

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

ATP: Trifosfato de Adenosina

ATP oxidado: 2',3'-Dialdehído ATP

ATPyS: Adenosina 5'-O-(3-tiotrifosfato)

bFGF: Factor de Crecimiento de Fibroblasto Básico

BzATP: 3'-O-(4-benzoilo) benzoilo ATP

COX-2: Cicloxigenasa 2

Cy5: Cianina 5

DAG: Diacilglicerol

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

dUTP-FITC: Desoxiuridina trifosfato conjugado a fluoresceína

E: Estroma ovárico

EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico

E2: Estradiol

FA: Folículo Antral

FasL: Ligando de Fas

FITC: Fluoresceína

FP: Folículo Primario

FSH: Folículo Estimulante
G: Células de la Granulosa
GABA: Ácido gamma-aminobutírico
GnRH: Hormona Liberadora de las Gonadotropinas
HGF: Factor de Crecimiento Hepatocitario
IL: Interleucinas
iNOS: Sintetasa de Óxido Nítrico
IP3: Inositol trifosfato
KGF: Factor de Crecimiento de Queratinocito
KN-62: 1-[N,O-bis(5-isoquinolina sulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4-fenilpiperazina
LH: Hormona Luteinizante
LPS: Lipopolisacárido
MMP: Metaloproteasas de Matriz
NANC: neurotransmisión No Adrenérgica No Colinérgica
NF- κ B: factor nuclear de la cadena ligera kappa de las células B activas
OO: Ovocito
OSE: Epitelio Superficial Ovárico
Panx1: Panexina 1
PBS: Solución amortiguadora de Fosfatos
PDGF: Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
PG: Células de la Pregranulosa
PI3K: Cinasa de Fosfolípidos
PKA: Proteína Cinasa A
PKC: Proteína Cinasa C
PLC: Fosfolipasa C
PLD: Fosfolipasa D
P1: Receptores a adenosina
P2: Receptores a ATP
P2X: Receptor canal activado por ligando
 Δ zfP2X4: Mutante de P2X4 de pez cebra (delección del amino y carboxilo)
P2Y: Receptor acoplado a proteína G

P4: Progesterona

RE: Receptores a Estrógenos

RP: Receptores a Progesterona

SNC: Sistema Nervioso Central

T: Células de la Teca

TBS: Solución amortiguadora Tris

TdT: Enzima Transferasa Desoxinucleotidil Terminal del ADN

TEM: Transición Epitelio-Mesénquima

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante beta

TM1: Dominio transmembranal 1 del receptor P2X

TM2: Dominio transmembranal 2 del receptor P2X

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa

TUNEL: Marcaje de los dUTPs mediante la enzima Transferasa Desoxinucleotidil Terminal

2MeSATP: 2-metilatio ATP