



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**“EXPRESIÓN DEL RECEPTOR PURINÉRGICO P2RY2 EN LAS CÉLULAS DE  
LA TECA EN EL SÍNDROME DEL OVARIO POLIQUÍSTICO”**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

QFB ANAÍ DEL ROCÍO CAMPOS CONTRERAS

TUTOR:

DR. FRANCISCO GABRIEL VÁZQUEZ CUEVAS  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. MARICELA LUNA  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

DR. GONZALO MARTÍNEZ DE LA ESCALERA  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MÉXICO, OCTUBRE 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Instituto de Neurobiología**

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: Anaí del Rocío Campos Contreras, cuyo título es: “Expresión del receptor purinérgico P2RY2 en las células de la teca en el síndrome del ovario poliquístico”, 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:**

Dra. Brenda Rocío Anguiano Serrano

---

**Secretario (Tutor):**

Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas

---

**Vocal:**

Dra. Laura Cristina Berumen Segura

---

**Suplente:**

Dra. Maricela Luna Muñoz

---

**Suplente:**

Dra. Wendy Portillo Martínez

---

Aprobado por el Comité Académico

---

Dr. Alfredo Varela Echavarría  
Coordinador del Programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología)

Este trabajo se realizó en el Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Francisco G. Vázquez Cuevas.

Este proyecto fue financiado por donativos del CONACyT (No 166725) y PAPIIT-UNAM (IN205114).

La autora recibió la beca CONACyT 555779.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por mi formación académica.

En particular agradezco a mi tutor, el Dr. Francisco G. Vázquez Cuevas, por el apoyo brindado en la realización del presente trabajo de investigación y su valiosa asesoría durante las dificultades presentadas durante la realización del mismo. Muchas gracias por la dirección durante mi formación profesional.

Al comité tutelar integrado por la Dra. Maricela Luna y el Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera, por sus valiosas aportaciones y sugerencias en cada uno de los exámenes tutelares y en la revisión del presente trabajo.

A los miembros del Jurado de examen de grado integrado por la Dra. Brenda Anguiano, la Dra. Laura Cristina Berumen Segura y la Dra. Wendy Portillo por su valiosa ayuda con la revisión de este escrito.

Al Dr. Mauricio Díaz Muñoz, por el apoyo recibido para la conclusión del presente estudio.

Al personal del bioterio, especialmente al M.V.Z José Martín García Servín y a la Dra. Alejandra Castilla León por el excelente apoyo técnico.

A la unidad de Microscopía, en especial a la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos y a la Biol. Exp. Martha Estela Albino Sánchez, por su apoyo en la adquisición de imágenes y la asesoría en la obtención de cortes histológicos.

A la unidad de proteogenómica, en especial a la Dra. Anaid Antaramian y a la M. en C. Adriana González Gallardo.

A la M. en C. Leonor Casanova Rico por su valiosa ayuda en los trámites administrativos.

Al personal de la biblioteca, en especial al Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela.

A la Dra. Edith Garay por toda la ayuda en la realización del proyecto y al Dr. Rogelio Arellano por las facilidades brindadas para desarrollar parte del trabajo en su laboratorio.

## **DEDICATORIAS**

Especialmente a mis padres: Federico y Rosa María y mis hermanos: Abraham F. y Rosangela, quienes siempre me han apoyado en todos mis propósitos y decisiones. Son ustedes quienes me han acompañado o a lo largo de toda mi vida. Muchas gracias por todo el cariño y felicidad que me han brindado.

A Christian C. Olguín, quien además de apoyarme en todo momento a lo largo de mis estudios de maestría, es un gran amigo. Agradezco el interés que siempre has demostrado por mi trabajo y metas.

A mis compañeros de la maestría, especialmente a Circe Wilke, Marina Jiménez, Rafael Moreno e Itzamná Moncada, por haber hecho la estancia en la maestría más amena y divertida.

A mis compañeros y amigos, Janeth Mora y Julio D. Reyes, por las charlas, sus consejos académicos y tantos momentos que siempre recordaré con cariño.

A mis compañeros del laboratorio B-11 y del laboratorio D-13 del Instituto de Neurobiología, quienes me ayudaron a tener un panorama más amplio con diversas discusiones acerca de este trabajo, en especial a Sofía Martínez y Carolina Castañeda.

*“Research is not a systematic occupation but  
an intuitive artistic vocation”*

A. Szent-Györgyi (1937)

## ÍNDICE

Contenido	Página
RESUMEN	iii
SUMMARY	iv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Foliculogénesis.....	3
2.2. Ciclo estral.....	5
2.3. Síntesis de las hormonas esteroideas.....	7
2.4. Síndrome del ovario poliquístico.....	9
2.5. Comunicación purinérgica.....	11
2.6. Receptores purinérgicos.....	13
2.7. El receptor purinérgico P2RY2.....	16
2.8. Posibles fuentes de ATP en el ovario.....	17
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
4. JUSTIFICACIÓN.....	21
5. HIPÓTESIS.....	22
6. OBJETIVOS.....	23
6.1. General.....	23
6.2. Particulares.....	23
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
7.1. Animales de experimentación.....	24
7.2. Análisis histológico de ovarios.....	25
7.3. Cuantificación de hormonas en el suero.....	25

7.4.	Cultivo primario de células de la teca .....	26
7.5.	Inmunofluorescencia .....	26
7.5.1.	StAR .....	26
7.6.	Registro de la actividad celular por microscopía de fluorescencia .....	27
7.7.	Western blot .....	27
7.8.	Análisis estadístico .....	28
8.	RESULTADOS .....	30
8.1.	Peso corporal .....	30
8.2.	Análisis del ciclo estral por medio de frotis vaginales.....	30
8.3.	Análisis histológico del ovario.....	31
8.4.	Cuantificación de las hormonas esteroideas .....	34
8.5.	Caracterización de los cultivos celulares.....	35
8.6.	Expresión del receptor P2RY2 en células de la teca en el PCOS.....	35
8.7.	Registro de los cambios en la $[Ca^{+2}]_i$ inducidos por UTP en cultivos primarios de teca aislada de ratas con un modelo de PCOS.....	37
8.8.	Efecto de la estimulación del receptor P2RY2 sobre la activación de la cinasa ERK .....	38
9.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	40
10.	RESUMEN DE RESULTADOS .....	44
11.	CONCLUSIÓN.....	45
12.	REFERENCIAS .....	46
13.	LISTA DE ABREVIATURAS .....	59
14.	ÍNDICE DE FIGURAS .....	61

## RESUMEN

El síndrome del ovario poliquístico (PCOS) es el trastorno endocrino más común en mujeres de edad reproductiva y es una importante causa de infertilidad. Dentro de las características de esta enfermedad destacan la presencia de quistes en el ovario, los cuales se distinguen histológicamente por una disminución en las células de la granulosa e hiperplasia en las células de la teca (TCs) y ciclos anovulatorios. Previamente se ha demostrado la expresión del receptor purinérgico P2RY2 en las TCs de ratón. Este receptor se reconoce como un regulador positivo de la proliferación y de la diferenciación celular en otros tejidos, por lo que su expresión pudiera ser relevante en la regulación del equilibrio proliferación-muerte celular de las TCs en el PCOS. En el presente estudio se indujo farmacológicamente un modelo de PCOS mediante la administración de 2 mg de valerato de estradiol (VE) en la etapa prepuberal y evaluamos la expresión y funcionalidad del receptor P2RY2.

Los animales tratados con VE mostraron las características típicas del PCOS, e.g., la presencia de quistes y anovulación. Se evaluaron los cambios en el  $(Ca^{2+})_i$  intracelular y los niveles de fosforilación de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK). La abundancia de P2RY2 disminuyó (valor de las medias,  $35 \pm 0.08\%$ ) en los animales tratados con VE. En concordancia, el incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a UTP fue menor en los animales tratados ( $29.7 \pm 3.02$  vs.  $45 \pm 3.97$  para  $10 \mu M$  y  $45.1 \pm 3.06$  vs.  $60.9 \pm 3.46$  para  $100 \mu M$ , animales tratados vs. control). Sin embargo, la fosforilación de ERK por UTP fue similar en los dos grupos.

A pesar de que no hemos analizado las consecuencias fisiológicas de los cambios observados en P2RY2, creemos que, dado que los ciclos hormonales se pierden en el PCOS, el P2RY2 podría estar señalizando de manera tónica. Esta condición podría tener un impacto positivo en la tasa de proliferación de las TCs favoreciendo el fenotipo del ovario poliquístico; sin embargo, esta idea debe ser respondida experimentalmente.

Palabras clave: síndrome ovario poliquístico, receptor purinérgico P2RY2, células de la teca.

## SUMMARY

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrine disturbance in reproductive-age women, and it is an important cause of infertility. One of the main characteristics of this disease is the presence of ovarian cysts which are histologically distinguished by loss of granulosa, hyperplasia of theca cells (TCs) and absence of ovulation. The expression of purinergic receptor P2RY2 was demonstrated previously in mouse TCs. In other tissues this receptor is a positive regulator of cell proliferation and differentiation; thus, its expression could be relevant in regulating TC proliferation vs. death in PCOS. In the present study we induced PCOS by a single dose of 2 mg of estradiol valerate (EV) to prepuberal rats and analyzed the changes that occurred; then we evaluated the expression and functionality of P2RY2.

Animals treated with EV showed the typical characteristics of PCOS, i.e., the presence of ovarian cysts and absence of ovulation. The changes in the intracellular  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{+2}]_i$ ) and in the ERK phosphorylation levels were estimated. P2RY2 abundance, measured by Western blot, diminished (mean values by  $35\pm 0.08$  %) in treated animals. In agreement, the increase in  $[Ca^{+2}]_i$  in response to UTP was less in EV-treated animals ( $29.7\pm 3.02$  vs.  $45\pm 3.97$  for 10  $\mu$ M and  $45.1\pm 3.06$  vs.  $60.9\pm 3.46$  for 100  $\mu$ M, EV treated vs. control, respectively). However, the induction of ERK phosphorylation by UTP was similar for both groups of animals.

Although we have not yet analyzed the physiological consequence of the changes observed in P2RY2, we reason that if hormonal cycles are lost in PCOS, then P2RY2 could be signaling in a tonic manner, and in some parameters ( $Ca^{2+}$  response) with a high potency. This condition might have a positive impact on the proliferation rate of TCs, favoring the PCOS phenotype; however, this idea should be experimentally tested.

Key words: polycystic ovary syndrome, purinergic receptor P2RY2, theca cells.

## 1. INTRODUCCIÓN

El síndrome del ovario poliquístico (PCOS, por sus siglas en inglés) es el trastorno endocrino más común en las mujeres. Es una patología que se creía que solo afectaba a mujeres en edad premenopáusica, sin embargo, hoy en día es una importante causa de infertilidad en las mujeres en edad reproductiva.

Fue descrito por primera vez por Stein y Leventhal (1930), como una patología que se caracteriza por la presencia de amenorrea, infertilidad, hirsutismo y ovarios con presencia de quistes. El PCOS también está asociado con hiperandrogenismo (clínico y/o bioquímico), obesidad, un aumento en la probabilidad de desarrollar cáncer de endometrio, resistencia a la insulina y riesgo de padecer diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares; asimismo se le reconoce como una manifestación ovárica del síndrome metabólico. El PCOS es muy heterogéneo, las pacientes no necesariamente presentan todas las características previamente mencionadas, lo que vuelve difícil su diagnóstico.

Actualmente, existen distintos criterios para poder identificar esta patología; de acuerdo al criterio de Rotterdam establecido en el 2003, se acepta la presencia del PCOS cuando se presentan al menos dos de las siguientes características:

1. presencia de quistes en los ovarios
2. hiperandrogenismo
3. anovulación

Actualmente, la etiología del PCOS se desconoce, sin embargo, se han descrito varias características del síndrome a nivel endocrino, ovárico y de la inervación simpática. Se ha establecido que en el PCOS hay mayor concentración plasmática de la hormona luteinizante (LH), lo que conduce a una mayor síntesis de andrógenos en las células de la teca de los folículos ováricos. Asimismo, se ha comprobado que hay mayor actividad de algunas enzimas esteroideogénicas tales como: la enzima  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $3\beta$ -HSD), el complejo enzimático P450<sub>scc</sub> (CYP11), el citocromo P450

17-hidroxilasa, 17,20-desmolasa (CYP17), entre otros (Gilling-Smith, et al., 1994; Comim, et al., 2013; Wickenheisser et al., 2012).

Por otra parte, se ha relacionado el aumento de la actividad simpática durante el PCOS, expresada en un aumento de la liberación de noradrenalina, con la formación de quistes ováricos (Lara et al., 1993). El ATP es coliberado con esta catecolamina en las terminales simpáticas (Westfall et al., 2002) lo que permite proponer que el ATP a través de la activación de sus receptores específicos participa en la señalización ovárica durante el PCOS. Diversos estudios han demostrado la expresión funcional de receptores purinérgicos P2 en el ovario de diversas especies. En nuestro laboratorio se ha demostrado la expresión de receptores P2RX y P2RY en las células de la teca (Vázquez-Cuevas et al., 2006; Vázquez-Cuevas et al., 2010). Existen numerosas evidencias que indican que el receptor P2RY2 participa en el proceso de proliferación celular y particularmente, se ha demostrado por nuestro grupo, la expresión de P2RY2 y la activación de las cinasas ERK 1/2 como consecuencia de su actividad en las células de la teca. Lo anterior nos ha llevado a considerar que existen diferencias en la expresión del receptor P2RY2 en la teca durante el PCOS.

Para abordar esta hipótesis utilizamos un modelo de ovario poliquístico generado en ratas mediante la administración de una única dosis de valerato de estradiol (VE) en ratas prepuberales e investigamos en cultivos primarios de teca 90 días post-administración del VE la expresión y funcionalidad de P2RY2.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Foliculogénesis

El folículo es la unidad anatómico funcional del ovario, su función es regular el crecimiento y maduración del ovocito hasta su liberación como un gameto capaz de ser fecundado (Gougeon, 2003). Este proceso se conoce como foliculogénesis e involucra el reclutamiento inicial de folículos primordiales del “pool” de reserva, el desarrollo de folículos primarios y secundarios, la formación de la cavidad antral y finalmente la selección del folículo o folículos ovulantes (Freeman, 2006).

Se han definido estadios de desarrollo de los folículos de acuerdo a características morfológicas distintivas. El folículo primordial consiste en el ovocito rodeado por una sola capa de células planas, cuando estas células adquieren un fenotipo cuboidal se considera un folículo primario (Figura 1). Posteriormente, las células que rodean al gameto proliferan y se diferencian en dos tipos celulares: las células de la granulosa y las células de la teca alcanzando al menos tres capas de células, en esta etapa se considera al folículo como secundario o preantral. Posteriormente, se comienza a apreciar la formación de espacios intercelulares llenos de líquido que al unirse forman una cavidad conocida como antro. El folículo antral también conocido como folículo de Graaf o terciario, se caracteriza por un antro de mayor tamaño lleno de líquido folicular. Así mismo es notable la presencia del “cumulus”, que consiste en células de la granulosa rodeando el ovocito (Freeman, 2006; Hennet & Combelles, 2012).

La mayoría de los folículos en desarrollo sufren atresia, proceso que define que solamente un número limitado de los folículos, de acuerdo a la especie, sea capaz de madurar. El crecimiento folicular culmina con la liberación del óvulo; tras la expulsión de éste, las células de la granulosa y la teca remanentes forman una glándula denominada cuerpo lúteo, cuya principal función es la secreción de progesterona (P4), el cuerpo lúteo

degenera si no hay fecundación (Gougeon, 2003; Freeman, 2006; Hunzicker-Dunn & Mayo, 2006).

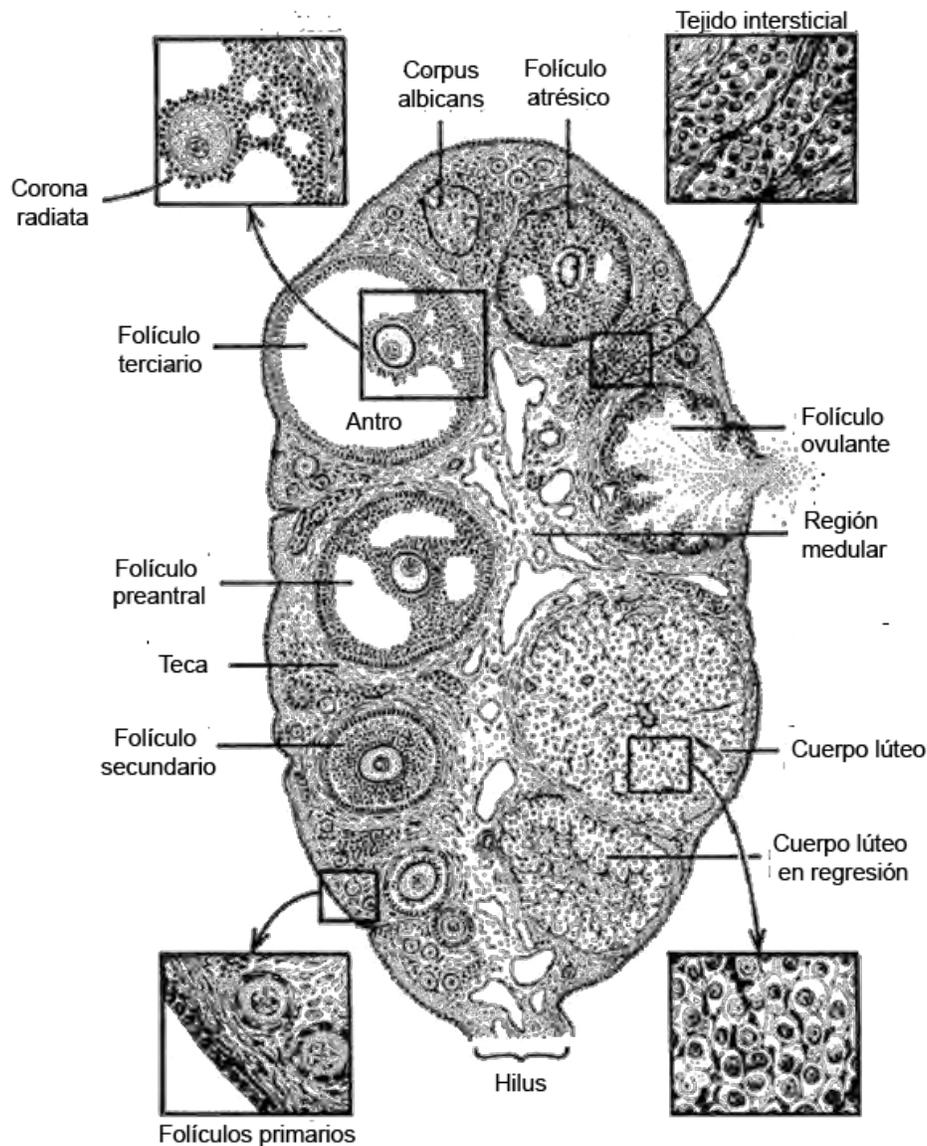


Figura 1. El desarrollo folicular en el ovario, se muestran esquemáticamente las etapas de la foliculogénesis. Modificado de Freeman, 2006.

Endocrinológicamente, el crecimiento y diferenciación de los folículos depende de las acciones de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH). Estas hormonas son liberadas por la adenohipófisis gracias a la acción de la hormona

liberadora de gonadotropinas (GnRH) secretada por el hipotálamo. La secreción de estas hormonas es regulada a través de un mecanismo de retroalimentación negativa ejercido por las hormonas esteroideas ováricas (Freeman, 2006).

## 2.2. Ciclo estral

Un ciclo reproductivo o ciclo estral es el conjunto de acontecimientos fisiológicos que se producen en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, durante intervalos cíclicos de tiempo como consecuencia de las variaciones en los niveles de las gonadotropinas y de las hormonas esteroideas. La rata es un mamífero poliéstrico, cuyo ciclo estral tiene una duración de aproximadamente 4 a 5 días y comprende cuatro fases: metaestro, diestro, proestro y estro. Se han descrito los tipos celulares presentes en los exudados vaginales de cada una de las fases (Figura 2), lo que permite predecir con exactitud la fase del ciclo estral en la que se encuentran las ratas (Long & Evans, 1964; Freeman, 2006).

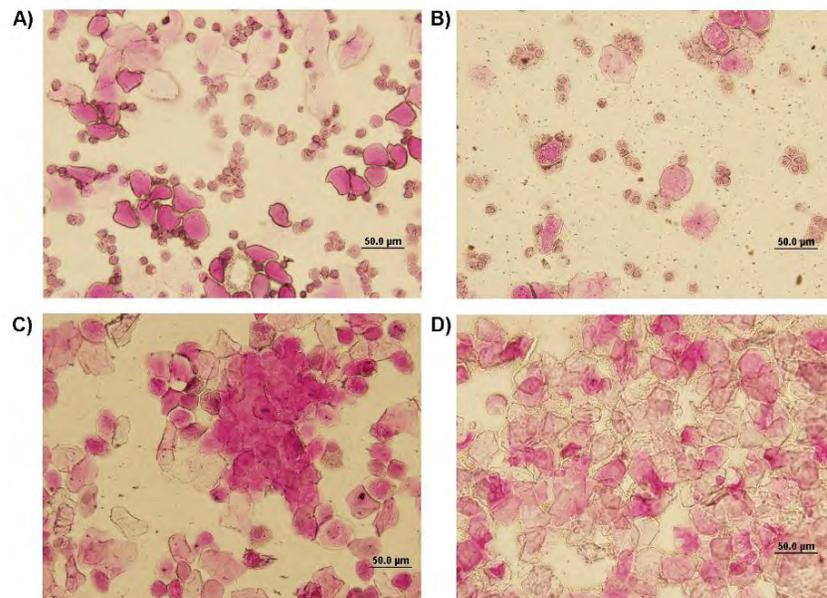


Figura 2. Exudados vaginales obtenidos durante las fases del ciclo estral: A) metaestro, B) diestro, C) proestro y D) estro. Las muestras fueron teñidas con hematoxilina y eosina y observadas en el microscopio óptico.

El metaestro (también llamado diestro-1) tiene una duración de 6 a 8 h. Durante esta fase incrementan los niveles de estradiol (E2) y P4 (Figura 3). El aumento de los niveles de E2 está relacionado con el crecimiento de los folículos en desarrollo, mientras que el aumento de P4 está asociado con el desarrollo del cuerpo lúteo. En el exudado vaginal de esta fase se observan múltiples leucocitos y algunas veces células cornificadas y nucleadas.

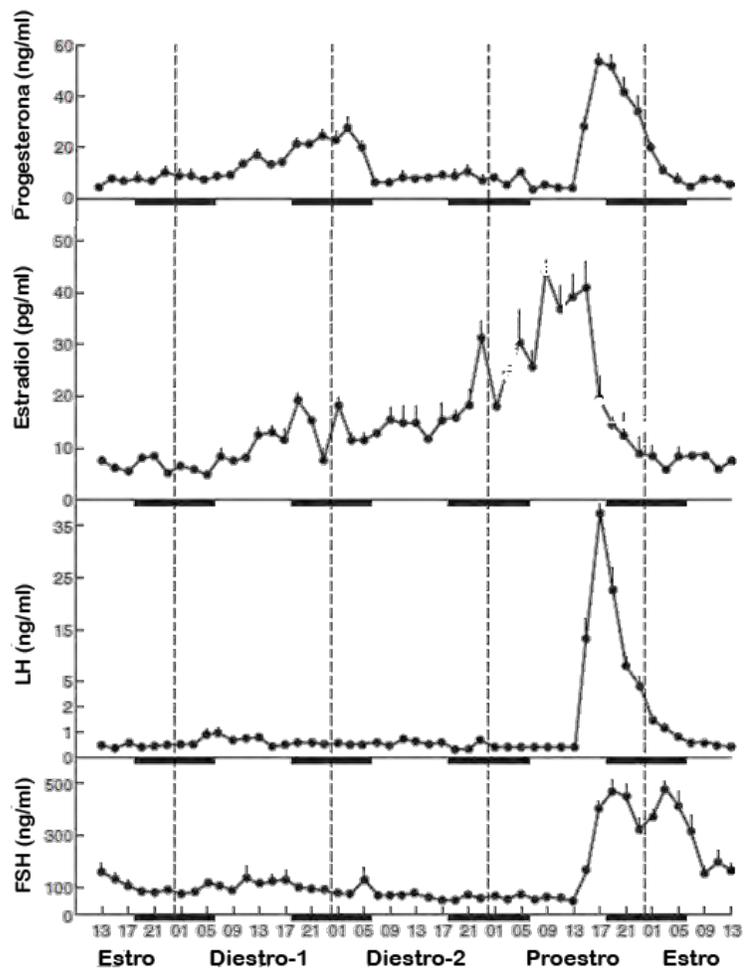


Figura 3. Concentración de hormonas obtenidas en intervalos de 2 horas durante el ciclo estral de la rata. Las barras negras en la parte inferior de la gráfica representan el periodo de oscuridad. Modificado de Smith et al., 1975.

La siguiente fase es el diestro (diestro-2), tiene duración de 55 a 57 h. Los niveles de E2 del metaestro continúan siendo similares, sin embargo durante esta fase comienza a decaer la concentración plasmática de P4 lo que significa la regresión del cuerpo lúteo. El exudado vaginal del diestro es similar al del metaestro, predominando la presencia de leucocitos (Smith et al., 1975; Freeman, 2006).

Posteriormente tiene lugar el proestro y tiene una duración de 12 a 14 h. Durante la tarde del proestro hay un incremento de los niveles de P4, LH y FSH, asimismo se observa el pico más alto de E2. En el exudado vaginal se observan células epiteliales nucleadas y algunas veces células cornificadas. La ovulación ocurre en la mañana del estro, dicho evento está asociado con el pico más alto de LH. El estro tiene una duración de 25 a 27 h. El frotis vaginal en esta etapa es muy característico y únicamente se observan múltiples células cornificadas.

### 2.3. Síntesis de las hormonas esteroideas

Los lugares primordiales de síntesis de hormonas esteroideas en el folículo ovárico son las células de la teca y las células de la granulosa foliculares o luteinizadas. Estas células poseen la maquinaria enzimática necesaria para la producción de estos mensajeros celulares (Jamnongjit & Hammes, 2006).

Las hormonas esteroides son sintetizadas a partir del colesterol que se obtiene del plasma sanguíneo, este puede ser adquirido del que se encuentra unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL), de la síntesis a partir de acetato por el propio ovario y del que se encuentra de libre acceso en la membrana celular o almacenado. Sin embargo, la principal fuente para el ovario es el que se encuentra unido a las LDL y es transportado por el torrente sanguíneo (Ho et al., 2003; Papadopoulos & Miller, 2012).

Las LDL reconocen receptores específicos en las células de la teca, una vez que se han unido a sus receptores, son endocitadas hacia el citoplasma donde el colesterol es liberado mediante la acción de estererasas. Posteriormente, el colesterol es

transportado a la mitocondria, gracias a la enzima StAR (steroidogenic acute regulatory protein, por sus siglas en inglés) donde comienza la biosíntesis esteroidea (Ho et al., 2003).

La biosíntesis de las hormonas esteroideas inicia con la transformación del colesterol en pregnenolona (Figura 4), lo que consiste en el rompimiento de la cadena lateral del colesterol llevado a cabo por un complejo enzimático conocido como citocromo P450<sub>scc</sub> (P450, side chain cleavage), esto involucra la acción en conjunto de las enzimas 20,22-hidroxilasa y 20,22-desmolasa; cabe mencionar que esta reacción es limitante en la síntesis esteroidea (Ho et al., 2003; Tsilchorozidou et al., 2004; Papadopoulos & Miller, 2012).

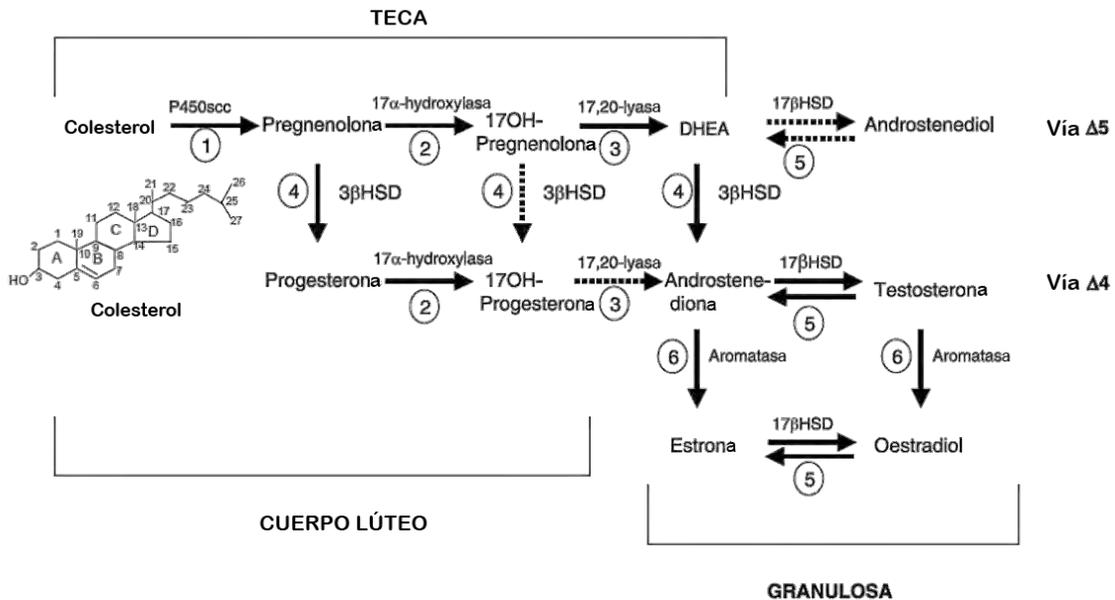


Figura 4. Síntesis de las hormonas esteroideas. Las hormonas esteroideas son sintetizadas a partir del colesterol. P450<sub>scc</sub>: complejo enzimático citocromo mitocondrial P450<sub>scc</sub> (P450, side chain cleavage); DHEA: dehidroepiandrosterona; 3β-HSD: 3β-Hidroxiesteroide deshidrogenasa; 17β-HSD: 3β-Hidroxiesteroide deshidrogenasa. Modificado de Tsilchrozidou et. al., 2004.

La pregnenolona puede seguir dos vías: la  $\Delta^4$  que es conocida también como la fase lútea y la  $\Delta^5$  que se le conoce también como fase folicular. La vía  $\Delta^4$  requiere de la enzima 3β-hidroxiesteroide-deshidrogenasa (3β-HSD) para catalizar la conversión de

pregnenolona a progesterona. Por otra parte, la vía  $\Delta^5$  depende de la actividad de la citocromo P450 17-hidroxilasa, 17,20-desmolasa (CYP17), la cual primeramente añade un grupo hidroxilo (-OH) a la pregnenolona para sintetizar 17-hidroxi pregnenolona y posteriormente la convierte al andrógeno dehidroepiandrosterona (DHEA). El mismo complejo CYP17 es el encargado de sintetizar androstenediona, que es también un andrógeno. A partir de la progesterona la androstenediona también puede ser sintetizada por acción de la  $3\beta$ -HSD sobre la DHEA. A su vez, la androstenediona es transformada a testosterona por la enzima  $17\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa ( $17\beta$ -HSD), o a estrona por la acción de la aromatasas, finalmente es convertida a estradiol por la enzima  $17\beta$ -HSD. De igual forma, el estradiol puede ser obtenido a través de la aromatización de la testosterona (Tsilchorozidou et al., 2004; Jamnongjit & Hammes, 2006).

El complejo CYP17 es expresado exclusivamente en las células de la teca y la actividad de síntesis de andrógenos es regulada por la LH. Por otra parte, los receptores a la FSH se expresan de manera exclusiva en las células de la granulosa (Hillier et al., 1994; Jamnongjit & Hammes, 2006). De esta manera, existe un acoplamiento entre las células de la teca y la granulosa para la óptima síntesis de estrógenos, lo que es conocido como teoría de las dos células. En el folículo en crecimiento, las células de la teca sintetizan los andrógenos, los cuales se transforman en estrógenos en la células de la granulosa mediante una reacción de aromatización (Edson et al., 2009). Se ha especulado que la desregulación de este mecanismo es un factor primario en la patogénesis del PCOS (Wickenheisser et al., 2006).

#### 2.4. Síndrome del ovario poliquístico

El PCOS es una endocrinopatía muy frecuente en las mujeres en edad reproductiva. Tiene una prevalencia estimada entre el 6 y 20%, esto dependiendo del criterio que se utilice para diagnosticarlo (March et al., 2010; Fauser et al., 2012; Jayasena & Franks, 2014). Dentro de las manifestaciones clínicas del síndrome destacan el hiperandrogenismo y la anovulación. Los ovarios se caracterizan por la presencia de

múltiples quistes en el ovario, que consisten en folículos que se atrofian y en los cuales no se observa el ovocito. Una característica preponderante de los quistes ováricos es hiperplasia de las células de la teca, las cuales son consideradas la fuente de la sobreproducción de andrógenos durante el PCOS (Dumesic & Richards, 2013; Legro et al., 2013).

Se ha demostrado que la capacidad de síntesis esteroidea de las células de teca aisladas de ovarios de mujeres con PCOS, es mayor en condiciones basales y en respuesta a la estimulación tanto con LH (Gilling-Smith et al., 1994) como con forskolina (Nelson et al., 1999), en comparación con células aisladas de mujeres sanas. Asimismo, estudios sobre el metabolismo de las hormonas esteroideas han evidenciado que las células de la teca de pacientes con PCOS presentan una mayor actividad de las enzimas  $3\beta$ -HSD y el complejo CYP17 (Nelson et al., 2001).

Por otra parte, se ha comparado la activación constitutiva de las MAP cinasas ERK entre células de la teca normales y con PCOS. Las ERK son mediadores de transducción de señales del citosol al núcleo y por lo tanto, regulan la transcripción de genes. Las ERK participan en el control de la proliferación celular y la diferenciación; se ha observado que la fosforilación de las cinasas MEK1/2 y ERK1/2 está reducida en las células de la teca durante el PCOS. Este resultado correlaciona con un incremento en la producción de andrógenos en este tipo celular ya que la transfección con la dominante negativa de MEK1 inhibió la producción de DHEA y el nivel de mRNA de CYP17 (Nelson-Degrave et al., 2005).

Con la finalidad de estudiar los mecanismos neuroendocrinos que regulan la generación y desarrollo del PCOS, se han utilizado diversos modelos experimentales que replican la mayoría de las características de la patología en humanos. Algunas estrategias que se han utilizado para inducir el PCOS en roedores son la administración de andrógenos, altas dosis de estrógenos, inhibidores de las aromatasas y antiprogestinas, al igual que mecanismos fisiológicos como la exposición a la luz y modificaciones genéticas (Walters et al., 2012).

Un modelo ampliamente utilizado por diversos grupos de trabajo, consiste en la administración de una dosis única de valerato de estradiol (VE), un estrógeno de vida media larga que al ser metabolizado produce ácido valérico y  $17\beta$ -E2 (Düsterberg & Nishino, 1982). Las ratas tratadas presentan reducción en el tamaño de los ovarios con quistes foliculares y ausencia de cuerpos lúteos, pérdida de la ciclicidad estral, alteraciones en la secreción de gonadotropinas y aumento en la actividad noradrenérgica (Brawer et al., 1978; Brawer et al., 1986; Schulster et al., 1984; Barria et al., 1993; Lara et al., 1993). La actividad de los nervios adrenérgicos presentes en el ovario incrementa antes de la formación de los quistes ováricos y se mantiene hasta su formación. Asimismo, se ha observado una relación con un decremento en los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en el tejido intersticial y en las células de la teca; se ha planteado que la inervación simpática participa en el desarrollo del PCOS, ya que la simpatectomía parcial revierte las características del síndrome y restaura la ciclicidad (Barria et al., 1993; Lara et al., 1993).

## 2.5. Comunicación purinérgica

El ATP es una molécula que además de su ya conocido papel como fuente de energía del metabolismo celular, ha mostrado ser un mensajero celular ubicuo y versátil. La primera evidencia de la participación de los nucleótidos de adenina como moléculas de señalización fue mostrada por Drury y Szent-Györgyi en 1929 (Drury & Szent-Györgyi, 1929; Burnstock, 2014). Mediante la utilización de extractos ricos en nucleótidos, observaron efectos fisiológicos en el corazón tales como la disminución de la frecuencia cardíaca y la dilatación de los vasos sanguíneos. Sin embargo, no fue hasta 1972 cuando Geoffrey Burnstock propuso que los nucleótidos de adenina son moléculas de señalización y planteó que los nucleótidos ejercen sus acciones fisiológicas a través de receptores específicos de membrana, de tal forma que estableció la terminología de “comunicación purinérgica” (Burnstock, 2013; Burnstock, 2014).

Se ha demostrado que una gran variedad de tipos celulares son capaces de liberar ATP bajo distintos estímulos tales como la distorsión mecánica, los impulsos eléctricos, la hipoxia, el aumento del volumen celular y la lisis celular. La liberación de ATP por lisis celular es la consecuencia de la muerte celular o daño celular, el cual puede ser en la misma célula o debido al daño en células contiguas. Sin embargo, este mecanismo carece de especificidad (Yegutkin, 2008). Los mecanismos de liberación de ATP específicos son: a través de canales, tales como los hemicanales de panexina y conexina, los canales maxianión, los canales aniónicos regulados por volumen e incluso el receptor purinérgico P2RX7 (Corriden & Insel, 2010); mediante transportadores específicos (transportadores ABC) y a través de liberación vesicular (Figura 5) (Burnstock & Verkhratsky, 2012).

Una vez que el ATP es liberado hacia el espacio extracelular, éste puede ser rápidamente hidrolizado por ectonucleotidasas, de tal manera que la acción del ATP está delimitada por estas enzimas. Estas enzimas además de controlar la duración de la activación de los receptores purinérgicos, producen ligandos adicionales tales como difosfato de adenosina (ADP) y adenosina (Ado). Se han descrito hasta el momento cuatro familias de ectonucleotidasas: las nucleótidos tri y difosfohidrolasas (E-NTPDasa), las nucleótido pirofosfato/fosfodiesterasas (E-NPPs), las fosfatasas alcalinas y ácidas (ALP y ACP) y las ecto-5'-nucleotidasas. Estas enzimas difieren en la especificidad de hidrólisis del sustrato, las NTPDasas y las NPPs hidrolizan ATP y ADP a AMP, que posteriormente se metaboliza a adenosina por las ecto-5'-nucleotidasas (Kukulski et al., 2011; Martínez-Ramírez & Vázquez-Cuevas, 2015).

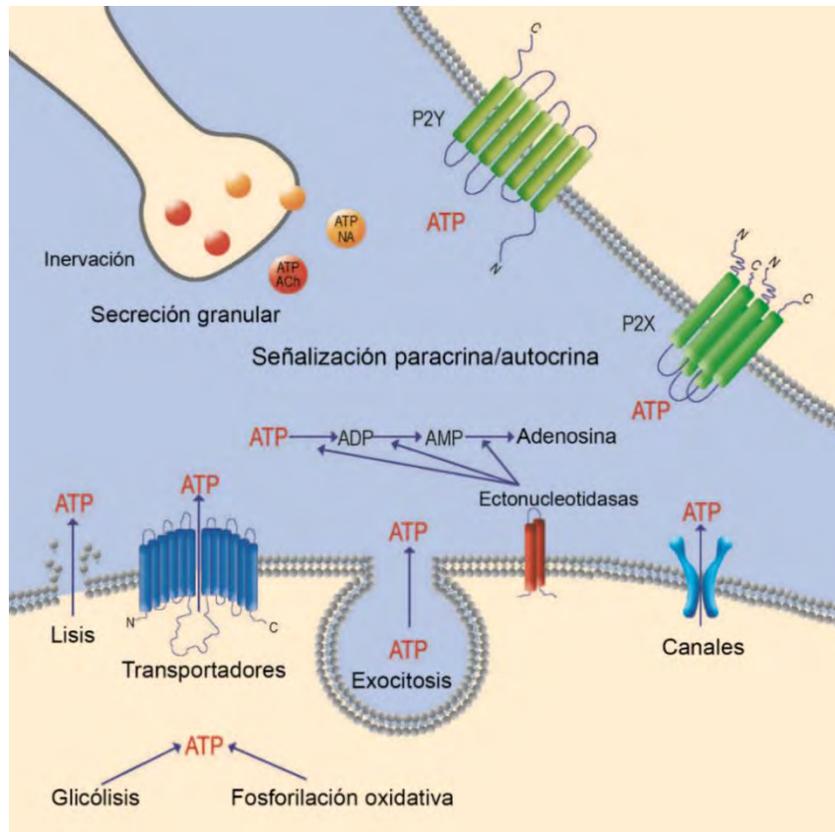


Figura 5. Mecanismos de liberación del ATP, una vez liberado en el medio es degradado por ectonucleotidasas ancladas en la membrana celular. El ATP y sus metabolitos actúan como mensajeros autocrinos y paracrinos. Modificado de Martínez-Ramírez y Vázquez-Cuevas, 2015.

## 2.6. Receptores purinérgicos

Los receptores purinérgicos han sido clasificados en dos familias: los receptores P1 y los receptores P2, siendo los primeros sensibles a adenosina. Por su parte, los receptores P2, sobre los que se centra el presente estudio, son sensibles a nucleótidos de adenina y uridina (ATP, UTP, ADP y UDP). Los receptores P2 se dividen de acuerdo a su estructura molecular y farmacología en dos subfamilias: los P2RX y los P2RY (Figura 6) (Burnstock, 2007; Burnstock & Verkhatsky, 2012).

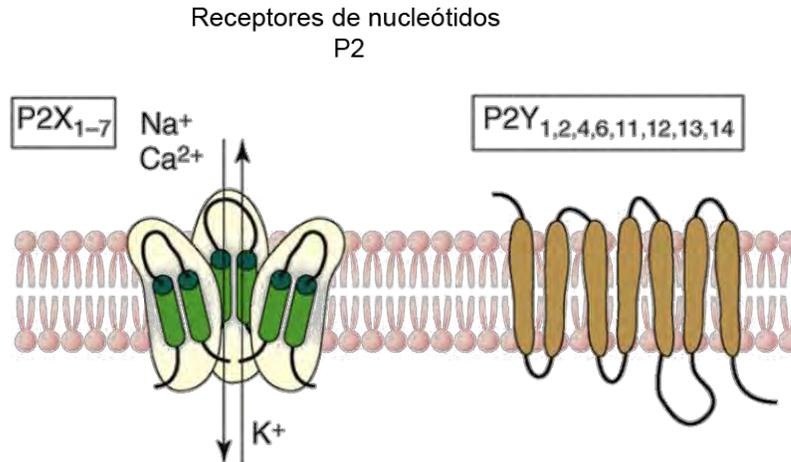


Figura 6. Receptores purinérgicos. Los receptores P2X son canales iónicos dependientes de ligando y los receptores P2Y son receptores con siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G. Modificado de Abbracchio et al., 2009.

Los receptores P2RX son canales iónicos activados por ligando que permiten el influjo de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{+2}$  y el eflujo del ion  $\text{K}^+$ . Existen siete genes que codifican para subunidades distintas: P2X1-7, las cuales son proteínas de 379 a 595 aminoácidos que presentan una identidad entre el 30-50%. Los receptores P2RX se conforman por tres subunidades que pueden ser del mismo subtipo formando un canal homomérico, o de subtipos diferentes lo que da lugar a canales heteroméricos (North, 2002; Burnstock, 2007; Burnstock & Verkhratsky, 2012). Cada subunidad posee un extremo  $-\text{NH}_2$  y un extremo  $-\text{COOH}$  con localización intracelular, dos dominios transmembranales (TM1 y TM2), unidos entre sí por una asa extracelular. El dominio TM2 forma la pared del canal. El asa extracelular es el sitio más extenso de la subunidad (280-300 aminoácidos) y contiene: el sitio de unión al ligando, 10 residuos conservados de cisteína (que permiten la formación de puentes disulfuro) y sitios de N-glicosilación. El extremo  $-\text{NH}_2$  contiene un sitio consenso de fosforilación por la proteína cinasa C (PKC) lo que posiblemente esté involucrado con la activación y desensibilización del receptor (North, 2002).

Los receptores P2RY son activados por nucleótidos de adenina y uridina (ATP y UTP) y por nucleótidos glicosilados (UDP-glucosa). Pertenecen a la familia de receptores de siete pasos transmembranales acoplados a proteínas G (GPCR) heterotriméricas. En

mamíferos, se han clonado ocho subtipos de receptores P2RY: P2RY1, 2, 4, 6, 11, 12, 13 y 14. Las proteínas contienen de 328 a 377 aminoácidos, y tienen una masa de 41 a 53 kDa. La estructura proteica, posee un extremo  $-NH_2$  terminal extracelular y un extremo  $-COOH$  terminal intracelular (Burnstock, 2007). Mediante estudios de mutagénesis dirigida, se ha demostrado que los receptores poseen aminoácidos cargados positivamente conservados en los segmentos transmembranas (TM) 3, 6 y 7, los cuales son necesarios para la activación por los nucleótidos (Abbracchio et al., 2006; Jacobson et al., 2015).

Los receptores P2RY1, P2RY2, P2RY4, P2RY6 y P2RY11 se acoplan preferencialmente a proteínas  $G_q/G_{11}$  que activan a la fofolipasa C (PLC), cuya actividad es hidrolizar al fosfolípido de membrana fosfatidil inositol bifosfato ( $PIP_2$ ) y generar los segundos mensajeros inositol-trifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DAG). El  $IP_3$  actúa sobre receptores localizados en la membrana del retículo endoplásmico lo que promueve la liberación de  $Ca^{+2}$  desde estos reservorios celulares y el DAG activa a la PKC. El resto de los receptores (P2RY11, P2RY12, P2RY13 y P2RY14) están acoplados a la proteína  $G_{i/o}$ , la cual inhibe a la adenilato ciclasa (AC), y consecuentemente conduce a una disminución en la concentración de AMPc intracelular y por ende a una inhibición de la actividad de la proteína cinasa A (PKA) (von Kügelgen & Harden, 2011).

Farmacológicamente, los receptores P2RY se pueden subdividir en aquellos que son activados por 1) ATP y ADP: P2RY1, P2RY12, P2RY13 (en humano y roedor) y P2RY11 (en humanos); 2) UTP y UDP: P2RY4 y P2RY6 (en humano), 3) de selectividad mixta: P2RY2 (en humano), P2RY4 (en roedor) y posiblemente P2RY11; 4) UDP-glucosa: P2Y14 (Jacobson et al., 2015).

## 2.7. El receptor purinérgico P2RY2

El receptor P2Y2 (P2RY2), previamente conocido como P2U, fue clonado de células de neuroblastoma de ratón. Codifica para una proteína de 373 aminoácidos con un peso aproximado de 42.9 kDa. El análisis de la secuencia de aminoácidos indicó que el receptor pertenece a la familia de GPCR. Se encontró que contiene dos sitios de  $-N$  glicosilación y sitios de fosforilación cerca del dominio  $-C$  terminal (Lustig et al., 1993). Posteriormente, el P2RY2 fue clonado en tejidos y células de humano, de rata y de puerco (Parr et al., 1994; Bowler et al., 1995; Chen et al., 1996; Shen et al., 2004).

El transcrito de P2RY2 se ha detectado en una amplia diversidad de tipos celulares, por ejemplo en el pulmón, en el corazón, en el músculo esquelético, en el bazo, en linfocitos, en macrófagos y en la médula espinal. Un menor nivel de expresión se ha detectado en hígado, en estómago y páncreas (Burnstock & Ralevic, 2014)

El receptor P2RY2 se activa de manera equipotente por ATP y UTP y no se activa por nucleótidos difosfatados (Nicholas et al., 1996). Se ha sugerido que ATP y UTP inducen estados activados distintos de P2RY2 y de esta manera interacciones diferentes con las  $\beta$ -arrestinas, las cuales juegan un papel en la desensibilización del receptor (Hoffmann et al., 2008). El P2RY2 puede desensibilizarse en varios tipos celulares, de modo que se ha indicado que la supresión de los sitios de fosforilación en el dominio  $-COOH$  intracelular disminuye la desensibilización e internalización dependiente del agonista (Garrad et al., 1998).

La suramina actúa como un antagonista competitivo del receptor P2Y2 en humano y rata (Charlton et al., 1996; Wildman et al., 2003).

Mediante estudios de mutagénesis dirigida, se ha demostrado que la sustitución de aminoácidos positivos de los segmentos TM6 y TM7 por aminoácidos neutros disminuye la potencia del receptor entre 100 y 850 veces, lo que sugiere que estas regiones juegan un papel importante en la interacción con el agonista (Erb et al., 1995).

Los receptores P2RY2 se acoplan preferentemente a la proteína  $G_{q/11}$  que activa a la  $PLC\beta_1$  que a su vez promueve la síntesis de  $IP_3$  y DAG, los cuales inducen la liberación de  $[Ca^{+2}]_i$  de los reservorios intracelulares y la activación de la PKC respectivamente.

El receptor P2RY2 tiene un dominio de unión a las integrinas denominado 'RGD' (arginina, glicina, aspartato) que está presente en su primer asa extracelular y permite la interacción selectiva con las integrinas  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_v\beta_5$ , acción que es eliminada por una mutación en la que se sustituye aspartato por glutamato (Erb et al., 2001). Las integrinas  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_v\beta_5$  regulan la angiogénesis y respuestas inflamatorias tales como la proliferación celular, la migración, la adhesión y la infiltración, respuestas que son también reguladas por la activación del P2Y2R (Kaczmarek et al., 2005).

Se ha demostrado que la estimulación de P2Y2R modula la proliferación de diversos tipos celulares. En este sentido, se ha reportado que promueve la proliferación de cultivos de glioma a través de la activación de las proteínas cinasas ERK (Tu et al., 2000). Asimismo, en células de músculo liso de aorta se ha mostrado que modula la expresión de genes dependientes del ciclo celular (Malam-Souley et al., 1996).

## 2.8. Posibles fuentes de ATP en el ovario

Actualmente se conoce con claridad el papel del ATP como cotransmisor en las terminaciones simpáticas y parasimpáticas donde se libera con NA y con acetilcolina (ACh) respectivamente. Por otra parte, se ha demostrado que este nucleótido también se colibera en el sistema nervioso central con neurotransmisores como el glutamato, la dopamina y el GABA (Abbracchio et al., 2009).

La coliberación del ATP con la NA en las terminaciones simpáticas ha sido demostrada en la sinapsis neuromuscular del *vas deferens* de roedor. Se ha descrito que la estimulación de los nervios resulta en una respuesta bifásica. De este modo, cuando el ATP es liberado por la terminal simpática actúa sobre los receptores P2RX7 e induce

una entrada rápida de  $\text{Ca}^{+2}$  que produce una primera contracción del músculo. Por otra parte, la NA mediante la activación de los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ , provoca una segunda contracción, mediante un mecanismo que involucra un aumento del  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  dependiente de  $\text{IP}_3$  (Westfall et al., 2002).

El ovario está inervado extrínsecamente por los componentes simpático y parasimpático y fibras sensoriales derivadas del sistema nervioso periférico conectadas por vías multisinápticas a las redes neurales del SNC (D'Albora et al., 2002). Las vías nerviosas simpáticas están compuestas por neuronas que contienen NA y neuropéptido Y (NPY) y las vías sensoriales por fibras que contienen sustancia (SP) y péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP). Ambos tipos de fibras contienen además péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Lawrence & Burden, 1980; Klein & Burden, 1988). La inervación simpática es aportada por dos vías: 1) por el plexo ovárico, que es una extensión de los plexos aórtico y renal y 2) por el nervio ovárico superior (SON) que se origina a partir del ganglio celiaco (Bahr, et al., 1974; Lawrence & Burden, 1980). En general, las fibras del SON inervan el tejido intersticial y los folículos en desarrollo, haciendo contacto con las células de la teca sin penetrar en los cuerpos lúteos.

De acuerdo a las moléculas señalizadoras presentes en la inervación ovárica y el papel del ATP como cotransmisor, podemos sugerir que éste nucleótido actúa en la regulación de la fisiología ovárica. Por otra parte, el ATP podría ser secretado por las células del folículo y actuar de manera paracrina dado que este mensajero celular es liberado en prácticamente en todos los tipos celulares por estimulación mecánica y estrés hipotónico (Corriden & Insel, 2010).

Mediante RT-PCR, Western-blot e inmunofluorescencia, se ha demostrado la expresión de diversos receptores purinérgicos P2XR y P2YR en los distintos compartimentos celulares que componen al ovario, por ejemplo en las células de la teca de mamífero se ha demostrado la expresión del receptor P2RX7 y que la estimulación de este con BzATP o ATP provoca muerte celular (Vázquez-Cuevas et al., 2006). En cultivos de este mismo tipo celular la activación de los receptores P2RY2 y P2RY6 induce

proliferación celular a través de la activación de las cinasas ERK1/2 (Vázquez-Cuevas, et al., 2010). Los datos previamente descritos sugieren que la comunicación purinérgica actúa como un modulador intraovárico en el balance de la proliferación y apoptosis en las células de la teca.

También se ha demostrado la expresión de P2RY2 en las células del cumulus y la granulosa de ratón (Tai et al., 2000; Tai et al., 2001a; Tai et al., 2001b). Recientemente, se mostró la expresión del receptor P2RX7 en las células del cuerpo lúteo (Wang et al., 2015).

Cabe mencionar que no existen reportes acerca de la expresión y función de receptores purinérgicos en las células de la teca durante el PCOS, en el presente estudio se muestra la primera evidencia de la expresión y funcionalidad del receptor P2RY2 en este tipo celular.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Experimentos realizados en nuestro laboratorio han demostrado la expresión de los receptores purinérgicos P2RY2 en cultivos primarios de teca. La estimulación de estos receptores induce proliferación celular a través de la activación de ERK1/2, así como también movilización de  $[Ca^{2+}]_i$  (Vázquez-Cuevas et al., 2010). Sin embargo, no hemos profundizado en su papel en la fisiopatología ovárica.

Debido a que las células de la teca representan el compartimento celular del folículo que está directamente involucrado con la producción de andrógenos y que durante el PCOS sufre cambios muy significativos en este padecimiento, el interés central del proyecto ha sido estudiar el estatus de la comunicación purinérgica y su posible participación en la serie de adaptaciones funcionales que llevan o sostienen el PCOS.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

Las células de la teca participan en la síntesis de las hormonas esteroideas en los folículos ováricos específicamente en la síntesis de andrógenos. Durante el PCOS el número de células de la teca incrementa al igual que su capacidad de síntesis.

Dado que estudios previos en nuestro laboratorio han puesto en evidencia la expresión del receptor purinérgico P2RY2 en cultivos primarios de teca de ratón y que la activación de dichos receptores promueve la proliferación, nos resulta de gran interés evaluar la expresión y funcionalidad de estos receptores en cultivos celulares de teca aislada de animales con un modelo de PCOS. Este es el primer estudio que evalúa componentes purinérgicos en las células de la teca durante esta patología.

## **5. HIPOTESIS**

Existen diferencias en la expresión del receptor purinérgico P2RY2, así como también en los mecanismos intracelulares mediados por la activación de estos receptores entre los cultivos primarios de células de la teca normales y cultivos provenientes de animales con el PCOS.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1. General

Determinar la expresión del receptor purinérgico P2RY2 en las células de la teca de ratas a las que se les ha inducido farmacológicamente el modelo de PCOS y evaluar la activación de respuestas celulares específicas inducidas mediante la estimulación con agonistas específicos.

### 6.2. Particulares

1. Confirmar el establecimiento del PCOS inducido mediante la administración de una única dosis de VE a ratas en edad prepuberal.
2. Determinar y evaluar la abundancia del receptor purinérgico P2RY2 en homogenados de cultivos primarios de teca de ratas control y ratas a las que se les indujo el PCOS.
3. Evaluar la funcionalidad de los receptores P2RY2 en cultivos primarios de células de la teca aisladas de ratas control y ratas a las que se les indujo el PCOS, mediante la estimulación con UTP, agonista selectivo de P2RY2, sobre el incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  y la fosforilación de las cinasas ERK.

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1. Animales de experimentación

Los animales utilizados en el presente estudio fueron proporcionados por el bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología, UNAM. Los procedimientos experimentales se realizaron acorde a las regulaciones establecidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Los animales se mantuvieron en el bioterio a 22°C de temperatura bajo condiciones controladas de luz-oscuridad (12 h/12 h) iniciando a las 7:00 h y con acceso libre a agua y alimento.

Se utilizaron ratas hembra de la cepa *Wistar* de 10 días de edad, las cuales fueron distribuidas en 2 grupos experimentales: el que recibió la administración de VE (2 mg, i.p.) y el control el cual recibió aceite de maíz (200 µL, i.p.).

Después de que los animales mostraron apertura vaginal (aproximadamente a los 40 días de edad), se procedió al monitoreo del ciclo estral mediante el análisis diario del exudado vaginal. Los frotis fueron teñidos con hematoxilina (10 min) y eosina (3 min) y observados en el microscopio de campo claro.

Noventa días después, las ratas se asignaron de manera aleatoria a cada uno de los diferentes experimentos contemplados en el presente estudio. Se analizó el índice de ciclicidad de los animales mediante la frecuencia de estros observados según:

$$\text{Índice de ciclicidad (IC)} = \frac{\text{número estros registrados}}{\text{número total de días evaluados}}$$

Cuando un animal fue cíclico se obtuvo un valor de 0.25, cuando el valor fue mayor indicó una mayor incidencia de estros y cuando el valor es menor indica la ausencia de estros (Vázquez-Cuevas, 1998).

## 7.2. Análisis histológico de ovarios

Las ratas fueron anestesiadas con xilacina/ketamina (1:25 mg/kg de peso corporal). A continuación, se les perfundió por punción intraventricular con solución amortiguadora de fosfatos (PBS; NaCl 136 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mM, pH 7.4). En este punto se disecaron ambos ovarios para ser procesados ya fuera para obtención de RNA total, homogenado total para detección de proteínas por Western blot o histología.

Los ovarios fueron separados del tejido y grasa circundante, posteriormente se incubaron en una solución de sacarosa al 10% durante 24 h a 4°C, con la finalidad de conservar las estructuras del tejido. Posteriormente, el tejido fue fijado con paraformaldehído al 4% (PFA) disuelto en PBS. El material fue incluido en parafina utilizando el equipo Histoquinet (Leica).

Se realizaron cortes de ovario de 8 µm utilizando un micrótopo . Los cortes fueron recolectados en portaobjetos para posteriormente ser teñidos mediante hematoxilina y eosina.

## 7.3. Cuantificación de hormonas en el suero

Los animales fueron sacrificados mediante decapitación e inmediatamente se prosiguió a la obtención del suero de la sangre. La sangre colectada fue almacenada a 37 °C durante 30 min. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 1500 rpm a 4°C durante 15 min. Los sueros colectados fueron almacenados a -25°C hasta su posterior análisis.

Se cuantificó mediante inmunoquimioluminiscencia las concentraciones plasmáticas de 17-β estradiol (E2), progesterona (P4) y testosterona (T).

#### 7.4. Cultivo primario de células de la teca

Se realizaron cultivos primarios de células de la teca de acuerdo al método de Magoffin y Erickson (Magoffin & Erickson, 1988). Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se disecaron ambos ovarios para ser colocados en medio L-15. Se prosiguió a la limpieza del tejido adiposo que rodea el ovario y eliminación de las células de la granulosa mediante la punción con una aguja hipodérmica. Posteriormente, el ovario se digirió e incubó durante 20 minutos en una mezcla de colagenasa, DNasa I y BSA. Finalizado el tiempo de digestión, la reacción se detuvo con medio DMEM/F12 suplementado con suero. El homogenado se fraccionó por centrifugación en un gradiente discontinuo de Percoll, del cual se obtiene el estrato correspondiente a las células de la teca. Las células obtenidas fueron cultivadas en medio DMEM/F12 suplementado con 10% de suero fetal de bovino y estreptomicina (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin). Los cultivos fueron mantenidos a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 7.5. Inmunofluorescencia

##### 7.5.1. StAR

Las células de la teca de rata fueron cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio estériles. Las células fueron fijadas con PFA al 4% por 25 minutos. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS por 5 minutos y se bloqueó por hora y media con leche 5% en solución PBS-T. Se realizó un lavado previo a la aplicación del anticuerpo primario anti-StAR (*Steroidogenic acute regulatory protein*) y se dejó la muestra incubando durante 24 h a 4°C.

Después de que se retiró el anticuerpo primario se realizaron 3 lavados con PBS-T. Posteriormente, se agregó el anticuerpo secundario (marcador con fluoróforo Alexa-Flúor 488), dejándose incubar durante 2 h a temperatura ambiente. A partir de entonces, las muestras se mantuvieron en condiciones de oscuridad para evitar el foto-blanqueo.

Se retiró el anticuerpo secundario y se realizaron lavados con PBS-T. Las muestras fueron fijadas con Vecta-Shield en un portaobjeto para poder ser analizadas mediante el microscopio de fluorescencia.

#### 7.6. Registro de la actividad celular por microscopía de fluorescencia

El registro del cambio de la concentración intracelular del ion calcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) permite monitorear la activación de los receptores P2 *in vitro*, debido a que este ion es un segundo mensajero movilizado por los receptores purinérgicos.

Para poder visualizar la movilización del  $[Ca^{2+}]_i$  mediante microscopía de fluorescencia, es necesario cargar a las células con Fluo-4 AM. Las células cargadas se colocan en una cámara de perfusión en la que podemos administrar diferentes sustancias. En el presente estudio, se utilizó el agonista purinérgico UTP.

Una vez en la célula, el  $Ca^{2+}$  liberado forma un complejo fluorescente con el Fluo-4 que puede detectarse a 419-516 nm (verde) en un microscopio de fluorescencia. Utilizando esta técnica podemos evaluar la respuesta celular de las células de teca provenientes de ratas con el modelo de PCOS ante la activación de los receptores purinérgicos y compararla con células de la teca de animales control. Las imágenes fueron analizadas con el software Image J (NCBI-EUA).

#### 7.7. Western blot

Las células de la teca fueron sembradas en cajas de cultivo de 12 pozos, en cada uno se colocó aproximadamente  $5 \times 10^4$  células. Los cultivos fueron sometidos a condiciones de privación de suero durante 3 h en medio DMEM sin suero. Transcurrido este tiempo, las células fueron incubadas con UTP 10  $\mu$ M durante el tiempo establecido en cada experimento. Al finalizar, se agregó solución de Laemmli con el propósito de lisar las células.

Posteriormente las proteínas fueron fraccionadas por electroforesis en geles de acrilamida al 10%. Las proteínas fraccionadas fueron transferidas a membranas de polivinil-difluoruro (PVDF, Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Con la finalidad de bloquear los sitios inespecíficos, las membranas fueron incubadas en una solución de leche al 5% durante 1 h en TBS-T (Tris base 20 mM, NaCl 0.137 M, HCl 3.8 mM). Se retiró el exceso de leche mediante un lavado con TBS-T. Se prosiguió a incubar las membranas con el anticuerpo primario correspondiente (anti-ERK fosforilado, anti-P2Y2 o anti-P2Y4) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las fueron lavadas con TBS-T para después incubar durante 1 h con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a HRP (Invitrogen, Co.). De igual forma, al finalizar las membranas fueron lavadas con TBS-T y ulteriormente reveladas por autoradiografía. El análisis densitométrico se realizó utilizando el software Image J (NCBI-EUA).

#### 7.8. Análisis estadístico

Todos los datos numéricos se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar. Los datos fueron sometidos a pruebas de homogeneidad de varianzas y de normalidad para determinar si tenían una distribución normal. Para los datos obtenidos del análisis de la histología del ovario: número de cuerpos lúteos y quistes, el peso del ovario y el peso de los animales de experimentación y las respuestas máximas de fluorescencia se procedió a realizar pruebas t-student. Los valores obtenidos de las concentraciones plasmáticas de las hormonas E2, P4 y T se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA).

Los experimentos de Western blot se cuantificaron por densitometría las bandas obtenidas y se normalizó al valor del basal. Posteriormente, los valores se analizaron por una prueba t-student. En el caso del análisis de la fosforilación de ERK dependiente del tiempo se realizó la prueba estadística ANOVA de dos vías (Factores: tratamiento x

tiempo) y los valores se normalizaron respecto a la mayor respuesta. En caso de diferencias significativas se realizó una prueba post hoc de Tukey.

Se utilizó el programa *Sigma Plot 12.0* para la realización de las pruebas estadísticas. Se consideró un valor de  $p \leq 0.05$  como estadísticamente significativo.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Peso corporal

Debido a que el PCOS ha sido relacionado con el síndrome metabólico (Diamanti-Kandarakis & Papavassiliou, 2006), el primer parámetro determinado fue el peso corporal 90 días post-administración del VE. Las ratas tratadas con VE presentaron un peso significativamente mayor que los animales control (Figura 7).

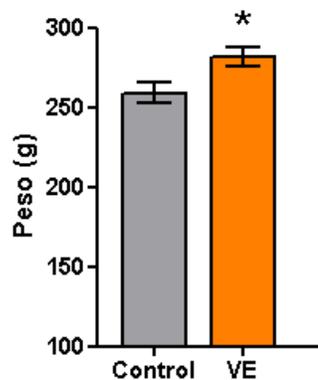


Figura 7. Peso de las ratas control y las ratas tratadas con VE, 90 días-postadministración del tratamiento. \* $p \leq 0.05$  (t-student).

### 8.2. Análisis del ciclo estral por medio de frotis vaginales

Como explicamos antes, el ciclo estral es el resultado de la sincronía funcional del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, por lo tanto, el análisis de este ciclo es fundamental para entender los cambios endocrinos que se dan en condiciones patológicas. Una forma sencilla de monitorearlo es por medio de la observación de la citología vaginal. A todos los animales bajo estudio se les realizó diariamente frotis vaginal, con el fin de detectar el establecimiento del PCOS.

Las ratas control mostraron ciclos de 4-5 días, con los distintos tipos celulares característicos de cada una de las fases del ciclo estral (Figura 2). El porcentaje de ratas

control que fueron cíclicas fue de  $84 \pm 0.02$  %. Mientras que las ratas que recibieron VE tuvieron pérdida de la ciclicidad, la cual se presentó en el día  $64 \pm 4.23$  post-administración del VE, los frotis vaginales de estos animales presentaron mayoritariamente células cornificadas, lo que indicó pseudo-estro persistente y ninguno de los animales fue cíclico. Con el fin de tener un análisis cuantitativo calculamos un índice de ciclicidad, como se detalla en la sección de materiales y métodos. De forma general, este índice refleja el número de estros por cada 4 días, así un animal cíclico tendrá un valor de 0.25. Las ratas control mostraron un índice de  $0.2867 \pm 0.02$ , mientras que para las ratas que recibieron VE fue de  $0.6475 \pm 0.065$  (figura 8G). Estos valores reflejan alteraciones endócrinas en los animales tratados.

### 8.3. Análisis histológico del ovario

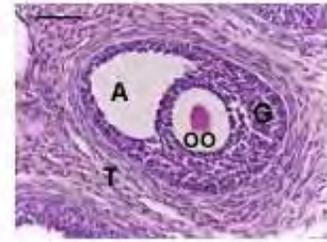
Con la finalidad de analizar los efectos de la administración de VE sobre la histología ovárica, se realizaron cortes de  $8 \mu\text{m}$  de ovarios embebidos en parafina, que fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Nuestra atención estuvo dirigida a dos aspectos específicos, el número de cuerpos lúteos y de quistes ováricos, debido a que la presencia o ausencia de estas estructuras evidencia la presencia de ovulación así como la efectividad de la inducción del síndrome.

La apreciación de los cortes obtenidos de animales control permitió observar folículos en diversos estadios y cuerpos lúteos (CL). Como se aprecia en la figura 8 A, en el tejido de un animal control se observan folículos primarios (FP), folículos secundarios (FS) y folículos antrales (FA). En estos últimos se pueden discernir los tipos celulares que lo componen: las células de la granulosa, las células de la teca y el ovocito (Figura 8 B y C).

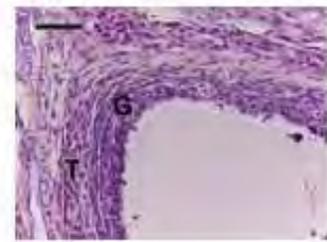
A)



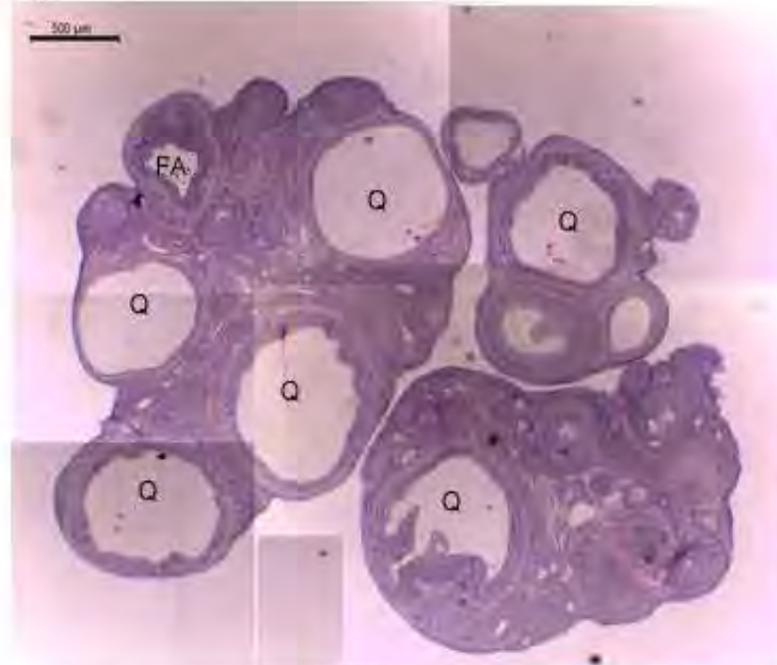
B)



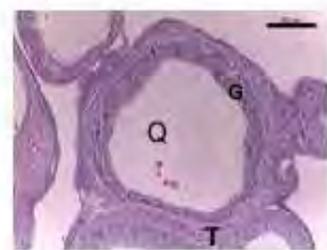
C)



D)



E)



F)



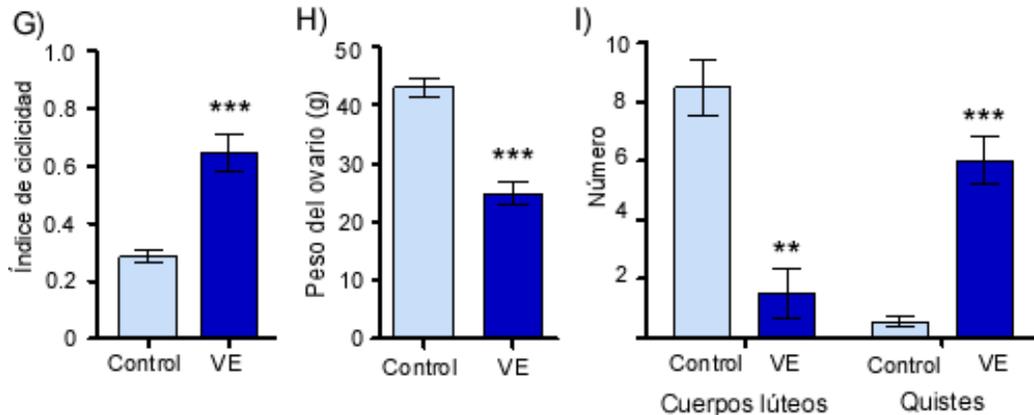


Figura 8. A) Corte transversal de un ovario completo, B) Folículo antral temprano y C) Detalle a mayor aumento del mismo folículo; donde se observan las células de la granulosa (G) y las células de la teca (T) de un ovario control. D) Corte transversal del ovario de una ratas tratada con VE. E) Quiste y F) Región a mayor aumento de un quiste. CL: cuerpo lúteo, FA: folículo en atresia, G: granulosa, OO: ovocito, Q: quiste. G) Pesos de los ovarios obtenidos de las ratas control y ratas tratadas con VE. H) Índice de ciclicidad. I) Número de cuerpos lúteos y quistes observados en cortes de ovario de ratas control y ratas tratadas con VE. \*\*\* $p \leq 0.01$ , \*\* $p \leq 0.01$  (t-student).

Por otra parte, en el ovario de los animales tratados con VE se observan múltiples quistes (Figura 8 D), los cuales se caracterizan por una disminución o ausencia de las células de granulosa, hiperplasia de las células de la teca y ausencia del ovocito (Figura 8 D y E).

El número promedio de cuerpos lúteos en ratas control fue de  $8.5 \pm 0.96$  y en ratas tratadas con VE de  $1.5 \pm 0.87$ ; el número de quistes en cada uno de los grupos fue de  $0.5 \pm 0.29$ ,  $6 \pm 0.82$  para control y VE respectivamente (figura 8 I). Así mismo, los ovarios obtenidos de los animales tratados con VE presentaron un menor peso que los controles (figura 8 H). En resumen, se puede afirmar que el análisis histológico confirma características correspondientes al PCOS en los animales tratados con VE.

#### 8.4. Cuantificación de las hormonas esteroideas

Se evaluaron las concentraciones plasmáticas de E2, P4 y T en un grupo de ratas control en diestro-1 (n=4), un grupo control en estro (n=4) y un grupo de ratas que recibieron la administración intraperitoneal de 2 mg de VE (n=9) a los 10 días de edad.

El análisis estadístico no mostró diferencias significativas de las concentraciones plasmáticas de E2 entre los grupos control en diestro-1, control en estro y VE ( $p = 0.115$ , (Figura 9 A). De igual manera, no se encontraron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de P4 entre los grupos experimentales ( $p=0.877$ ; figura 9 B).

Las concentraciones plasmáticas de testosterona se muestran en la figura 9 C. El análisis estadístico de los datos no mostró diferencias significativas entre los grupos ( $p=0.241$ ).

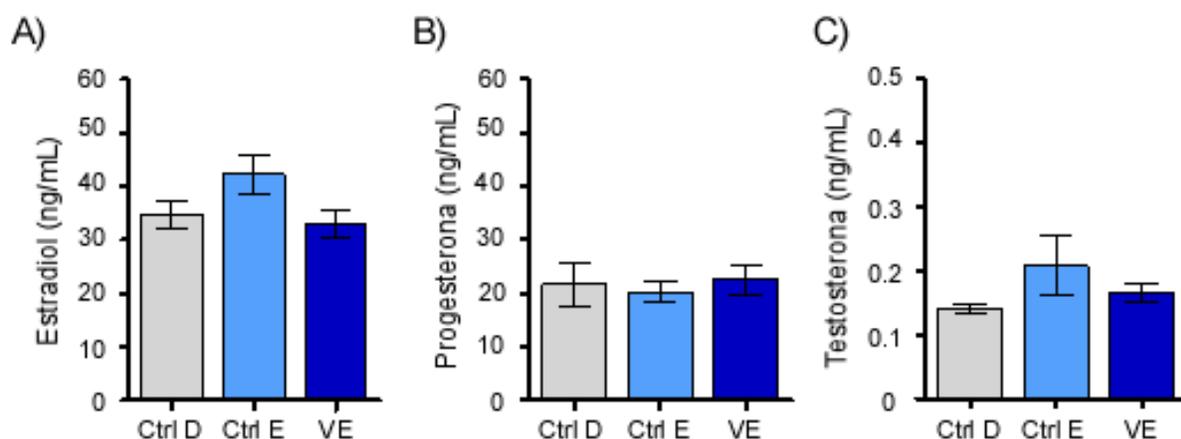


Figura 9. Concentración (ng/mL) de A) estradiol, B) progesterona y C) testosterona en el suero de ratas control (Ctrl) en diestro-1 (D), en estro (E) y en ratas con el modelo de PCOS inducido mediante la administración de VE.

Con el análisis de la citología vaginal, el análisis histológico y de la concentración de hormonas esteroideas, se observa que la administración de VE i.p. a ratas de 10 días de edad provoca aciclicidad, estro persistente y quistes en los ovarios. Por lo tanto

podemos afirmar que se ha inducido un modelo de PCOS que cumple dos características importantes de la patología en humanos.

#### 8.5. Caracterización de los cultivos celulares

Con el objetivo de corroborar que el aislamiento de las células de la teca fue realizado con éxito en términos de pureza se prosiguió con la detección de la enzima *steroidogenic acute regulatory protein* (StAR, por sus siglas en inglés) una enzima de la esteroidogénesis que se expresa específicamente en las células de la teca. Con este fin, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia empleando un anticuerpo primario dirigido contra la enzima StAR y un anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo Alexa-fluor 488. Como referencia anatómica se marcó el núcleo con el colorante fluorescente 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), el cual se une a regiones enriquecidas en timina y adenina en el DNA.

Los cultivos obtenidos fueron positivos para la expresión de StAR (señal verde), la distribución de la inmunoreactividad fue citoplásmica, acorde con la localización mitocondrial de la enzima. En preparaciones control en las que se omitió el anticuerpo primario no se observó inmunoreactividad (Figura 10). Por medio de conteo directo estimamos que el  $94 \pm 8$  % de las células son positivas para StAR, demostrando que la preparación está altamente enriquecida con células tecales.

#### 8.6. Expresión del receptor P2RY2 en células de la teca en el PCOS

Para investigar la expresión del receptor P2RY2 en las células de la teca, se analizaron homogenados mediante western blot de cultivos primarios de teca aislados de ratas control y de ratas a las que se les indujo el PCOS. Para el análisis de la abundancia relativa se utilizó como proteína constitutiva a la  $\beta$ -actina.

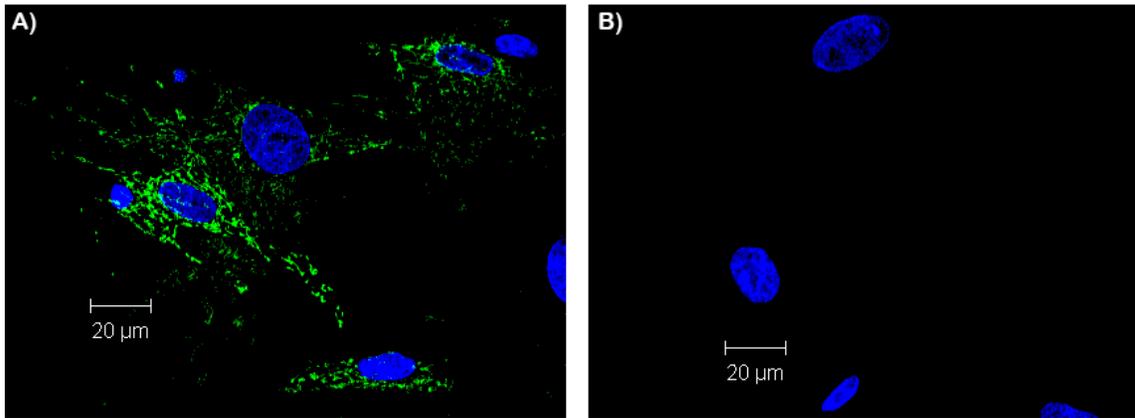


Figura 10. Inmunodetección de la enzima StAR en células de la teca de rata. A) La enzima Star fue localizada en células de la teca empleando un anticuerpo contra la enzima y un anticuerpo secundario acoplado al colorante fluorescente Alexa-flúor 488 (señal verde). B) Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI (azul).

En el ensayo se detectó una banda de aproximadamente 58 kDa (figura 11 A). La abundancia del receptor fue aproximadamente un 40% menor en el grupo de animales tratados con VE ( $p < 0.01$ ) (figura 11 B). Dada la expresión del P2RY2, un receptor sensible a UTP, se consideró pertinente estudiar aspectos relacionados con su funcionalidad.

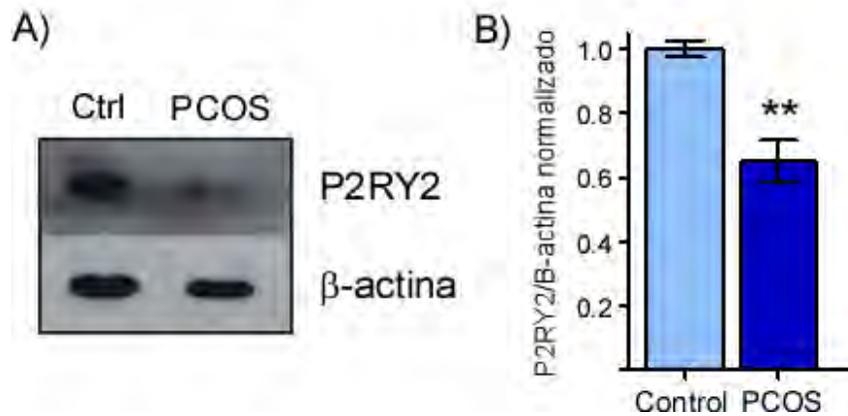


Figura 11. Expresión del receptor purinérgico P2RY2. A) Imagen representativa de la detección de P2RY2 por western blot en lisados de células de la teca de ratas control y células de la teca de ratas con el modelo de PCOS. B) Cuantificación de la densitometría de experimentos independientes. \*\* $p < 0.01$  (t-student).

### 8.7. Registro de los cambios en la $[Ca^{+2}]_i$ inducidos por UTP en cultivos primarios de teca aislada de ratas con un modelo de PCOS

Con el fin de investigar si los cambios en la abundancia del receptor P2RY2 se reflejan a nivel funcional, analizamos los cambios en la movilización de  $[Ca^{+2}]_i$  inducido por la estimulación con el agonista selectivo UTP. En estudios de nuestro laboratorio calculamos una EC50 de  $3.5 \pm 1.01 \mu\text{M}$ , en células de la teca de ratón, del mismo modo observamos que a  $100 \mu\text{M}$  del ligando se puede registrar la respuesta máxima (Vázquez-Cuevas et al., 2010). Por tanto los registros se realizaron a una concentración cercana a la EC50 ( $10 \mu\text{M}$ ) y a una concentración saturante ( $100 \mu\text{M}$ ).

En la figura 12 A, se muestra un segmento de una secuencia de imágenes de la respuesta celular a la aplicación de UTP  $100 \mu\text{M}$ . Como se observa en la serie fotográfica, segundos después del estímulo se observa un aumento de la fluorescencia en la región perinuclear sugiriendo que el aumento de  $Ca^{2+}$  proviene de liberación del retículo endoplásmico. No podemos descartar que esta respuesta sea la sumatoria de la activación del receptor P2RY2 y el receptor P2RY4, el cual en roedores es también sensible a UTP.

La respuesta máxima a un estímulo con UTP  $10 \mu\text{M}$  en las células de la teca control ( $n=56$ ) fue de  $145 \pm 3.967\%$  del basal, mientras que la respuesta de las células provenientes de ratas con PCOS ( $n=63$ ) fue de  $129.7 \pm 3.015\%$  del basal ( $p < 0.01$ ) (figura 12 C). De igual manera se encontraron diferencias significativas entre las respuestas celulares al estímulo de UTP  $100 \mu\text{M}$ . La respuesta de las células control ( $n=76$ ) fue de  $160.9 \pm 3.456\%$  del basal y de las células con el modelo de PCOS ( $n=76$ ) fue de  $145.1 \pm 3.060\%$  del basal ( $p < 0.001$ ) (figura 12 C).

Estos datos indican que la disminución en la abundancia del receptor P2RY2 se evidencia de igual forma en los experimentos funcionales ya que hemos encontrado menor respuesta a la estimulación con UTP, un agonista de P2RY2.

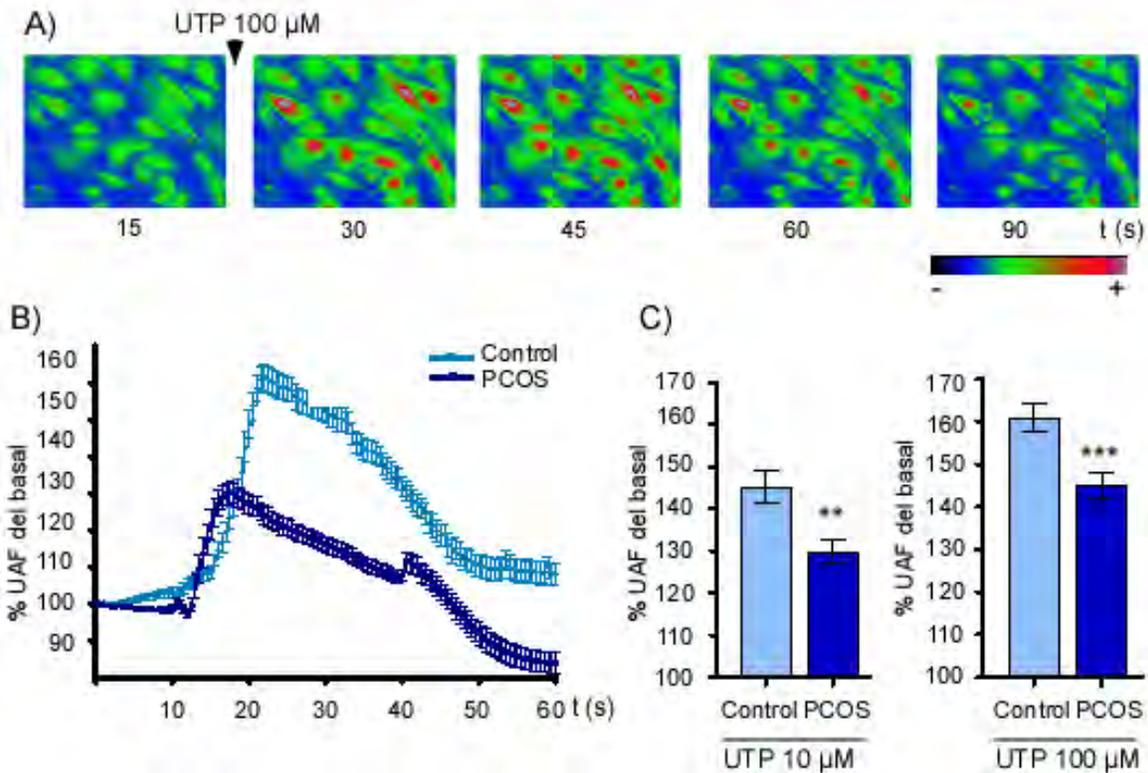


Figura 12. Movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en las células de la teca. A) Secuencia representativa de imágenes de fluorescencia en donde se observa el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  por la estimulación con UTP 100  $\mu\text{M}$ , en células de la teca provenientes de animales a los que se les ha inducido el PCOS. B) Trazos representativos de las respuestas de incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  en cultivos primarios de células de la teca aisladas de animales control en la fase proestro o de animales con el modelo de PCOS. Las células fueron estimuladas con el agonista UTP (100 M). C) Se grafican los cambios en los valores de fluorescencia máximos (unidades arbitrarias de fluorescencia, UAF), con respecto al valor de la fluorescencia basal obtenidos por la aplicación de cada tratamiento. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (t-student).

### 8.8. Efecto de la estimulación del receptor P2RY2 sobre la activación de la cinasa ERK

Existe evidencia experimental que demuestra que la estimulación de células de la teca con UTP induce la activación de ERK 1/2 por un mecanismo que involucra el aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y la participación de la PKC (Vázquez-Cuevas et al., 2010). Con el fin de explorar si la menor expresión del receptor P2RY2 incide sobre la capacidad del UTP para activar mecanismos intracelulares, analizamos la fosforilación de ERK 1/2 en

distintos intervalos de tiempo en cultivos primarios aislados de animales control en la fase de proestro y cultivos de animales con PCOS.

En las células control se observó que el estímulo con UTP es capaz de inducir la activación de las cinasas ERK desde el minuto 1, esta respuesta alcanzo su máximo a los 5 minutos de estimulación y paulatinamente decayó, a los 30 minutos alcanzó niveles cercanos al basal (Figura 13). Las células provenientes de individuos a los que se les indujo el PCOS respondieron de manera similar sin embargo debe destacarse que el nivel de fosforilación observado en el minuto 1 tiende a ser menor, lo que sugiere que es necesario un estudio con mayor detalle pues la velocidad de activación parece ser menor.

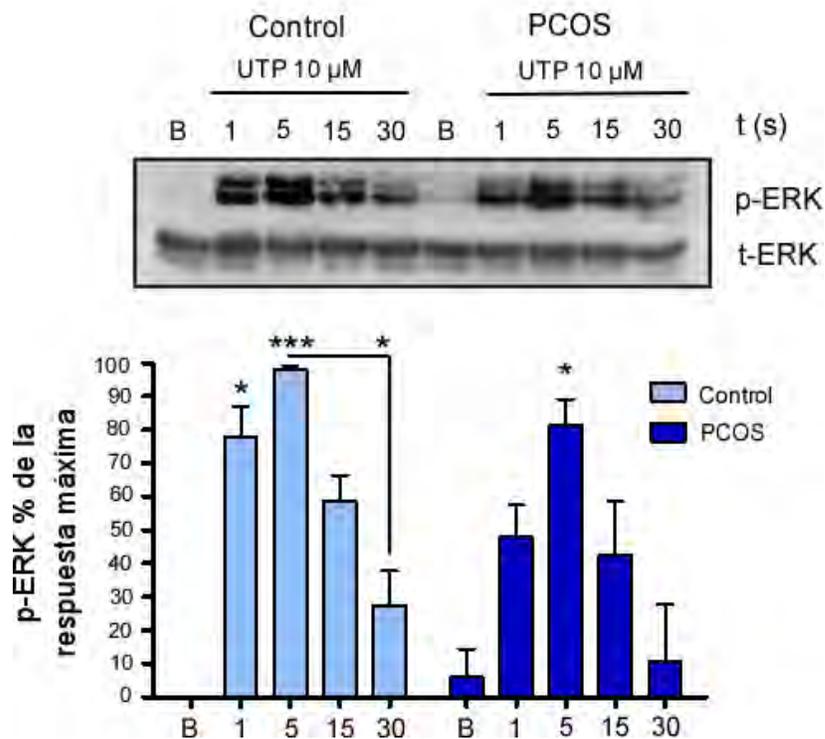


Figura 13. Efecto de la estimulación con UTP 100 μM en la fosforilación de ERK en células de la teca. Las células fueron incubadas durante cada uno de los tiempos indicados y se observó el efecto en la fosforilación de la cinasa ERK. Se muestra un western blot representativo de las bandas obtenidas y la cuantificación de la densitometría de experimentos independientes. pERK se refiere a las proteínas ERK fosforiladas y tERK se refiere a las proteínas ERK totales. ANOVA de dos vías [Factor A: tratamientos (Control vs. PCOS); Factor B= tiempo]; \*p<0.05, \*\* p<0.01 \*\*\*p<0.001.

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El síndrome del ovario poliquístico es un padecimiento endocrino con una alta incidencia en la población de mujeres en edad reproductiva, sin embargo su etiología aún no se comprende en su totalidad. La mayor parte de los estudios relacionados a las alteraciones relacionadas al PCOS se han centrado en la descripción de la secreción alterada de las gonadotropinas por la dupla hipotálamo-hipófisis. Sin embargo, evidencia sólida pone de manifiesto que los mecanismos intraováricos experimentan alteraciones importantes durante el desarrollo del PCOS. Por ejemplo, se ha descrito que la secreción de NE por la inervación simpática (Lara et al., 1993) y la densidad de fibras noradrenérgicas aumenta durante el síndrome (Anesetti & Chávez-Genaro, 2015).

Así mismo, se ha demostrado que en las terminaciones nerviosas simpáticas se coliberan NA y ATP en concentraciones equimolares (Burnstock et al., 1976; Westfall et al., 2000), lo que sugiere que los efectos fisiopatológicos atribuidos a la NA podrían involucrar al sistema purinérgico. En este mismo sentido varios grupos de trabajo han puesto de manifiesto la importancia de la comunicación purinérgica como modulador intraovárico del desarrollo folicular (revisado en Burstock 2014; Martínez-Ramírez & Vazquez-Cuevas 2015).

Con el fin de iniciar el análisis del posible papel de la comunicación purinérgica en el PCOS utilizamos un modelo del síndrome basado en la administración de VE, un estrógeno sintético de larga vida media. Se ha demostrado que la administración de una única dosis de VE antes de la pubertad induce un fenotipo que replica varias características que se asemejan al PCOS en humanos (Schulster et al., 1984).

De acuerdo con el criterio de Rotterdam, que enuncia que dado que el PCOS es un síndrome heterogéneo, se puede considerar que si se presentan 2 de las principales características, el PCOS se ha establecido. Los resultados del presente estudio confirman la inducción del PCOS y consisten en las siguientes observaciones: 1) Mientras que nuestros animales control mostraron ciclos estrales principalmente de 4 días, la administración de VE a ratas de 10 días de edad, provocó aciclicidad a partir del día 64

± 4.3 postinyección, la citología correspondió a arresto en pseudo-estro persistente; 2) los ovarios de los animales tratados con VE mostraban menor tamaño que los de los animales control presumiblemente debido a la ausencia de crecimiento folicular, esta observación está acorde a lo descrito en estudios anteriores (Brawer et al., 1978); 3) en los ovarios de animales tratados con VE se observó una disminución dramática en el número de cuerpos lúteos, indicando que estas ratas eran anovulatorias; 4) el tratamiento con VE indujo el surgimiento de quistes ováricos y 5) el análisis de la concentración plasmática de hormonas esteroides demostró que las ratas tratadas con VE presentan concentraciones bajas de  $17\beta$ -estradiol, comparables con animales en el diestro 1.

Con estas evidencias consideramos que el PCOS se estableció adecuadamente, lo cual nos permitió continuar con el desarrollo del proyecto. Particularmente y como se describe en la sección introductoria, en nuestro grupo de trabajo hemos identificado la expresión de receptores purinérgicos P2RY2 en las células de la teca de ratón, en las que se demostró que la activación de este receptor promueve la proliferación celular a través de la activación de la PKC y de las MAPK-ERK (Vázquez-Cuevas et al., 2010). La capacidad del receptor P2RY2 para modular la activación de ERK sugiere que es un importante modulador de la función ovárica.

Otro aspecto que imprime importancia en el estudio del receptor P2Y2 es capacidad para transactivar al EGFR (Ratchford et al., 2010), la señalización mediada por este receptor tiene gran importancia en la regulación de la proliferación y de la diferenciación celular (Pandiella et al., 1988). En el PCOS se ha mostrado que el LHR es capaz de transactivar al EGFR (Light & Hammes, 2013).

De esta manera, el receptor P2RY2, puede incidir en diferentes aspectos de la fisiología de las células de la teca. Así, nuestras preguntas experimentales se enfocaron en analizar la expresión y función del receptor P2RY2 en las células de la teca por dos razones fundamentales: 1) las células de la teca son el único componente del folículo que se encuentra inervado por terminales simpáticas y 2) existe un papel preponderante de

este tipo celular en el PCOS dado que es el tipo celular encargado de la síntesis de andrógenos.

En cultivos primarios de células de la granulosa luteinizadas humanas y de rata se ha demostrado que la hCG, a través del receptor de la LH, modula la expresión del mRNA de P2RY2 por medio de la regulación de la adenilato ciclasa (Tai et al., 2000). De acuerdo con estas observaciones, es posible que la vía canónica de la LH participe en el control de la expresión del receptor P2RY2 en las células de la teca. Por otra parte, se ha reportado que la estimulación de líneas de cáncer de mama con  $17\beta$ -E2, produce una disminución de la expresión del receptor P2RY2 (Li et al., 2011). Estos datos refuerzan la noción de un posible mecanismo de regulación de las gonadotropinas y/o hormonas esteroideas sobre la expresión de los receptores P2RY2. Por tanto dado que los picos preovulatorios de gonadotropinas y de estradiol se observan durante la tarde del proestro, realizamos un análisis de la abundancia relativa de P2RY2 y de su funcionalidad comparando contra células de animales control en este día del ciclo.

El análisis de la expresión del receptor P2RY2 indicó que su abundancia disminuye como consecuencia del tratamiento con VE. Esta observación sugiere que la señalización dependiente de este receptor podría estar atenuada; sin embargo, debe considerarse que en estas ratas no se presentan ciclos hormonales por lo que posiblemente P2RY2 se esté expresando de manera tónica y, por tanto, activando de manera constante sus mecanismos de señalización.

El análisis funcional del receptor P2RY2 fue realizado utilizando dos estrategias: 1) registro del aumento de la concentración de  $[Ca^{+2}]_i$  y 2) análisis de la activación de las MAPK-ERK en respuesta a UTP. El estímulo con UTP 10 ó 100  $\mu$ M indujo un incremento en la  $[Ca^{+2}]_i$  en células provenientes de ambos grupos de animales, esta primer observación indica que los receptores sensibles a UTP mantienen su acople con las proteínas Gq y por tanto su capacidad para movilizar  $Ca^{2+}$ . La amplitud máxima de la respuesta al estímulo con UTP (10 y 100  $\mu$ M) fue menor en las células de la teca provenientes de ratas tratadas con VE, acorde con la menor abundancia del receptor P2RY2 observada en el Western blot.

Respecto a la activación de ERK, en ambos grupos se observó el nivel máximo de la respuesta a los 5 minutos de estimulación con UTP; esta respuesta disminuye paulatinamente y a los 30 min ha alcanzado niveles cercanos al basal. No detectamos diferencias entre los animales tratados con VE y el grupo control en proestro. Lo que sugiere que no obstante los bajos niveles de expresión del receptor su capacidad para inducir la activación de las ERK, proteínas involucradas en la inducción de la proliferación, permanece intacta y presumiblemente tónica; lo cual puede conferirle un papel en el mantenimiento de la tasa proliferativa en células de la teca. Sin embargo se requiere de más experimentos que permitan profundizar en este tópico.

El presente proyecto ha sentado las bases para estudios mecanísticos acerca del papel del receptor P2RY2 en el PCOS, abriendo una gran cantidad de preguntas que permitirán definir el papel del receptor en los cambios relacionados al PCOS.

## 10. RESUMEN DE RESULTADOS

1. Se confirmó que la inyección de VE a los 10 días de edad induce el síndrome del ovario poliquístico en ratas de la cepa Wistar analizadas 90 días post inyección.
2. La abundancia del receptor P2RY2 disminuye en las células de la teca en ratas a las que se les ha inducido el PCOS.
3. Los receptores P2RY2 son funcionales, la respuesta de movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por UTP 10 ó 100  $\mu\text{M}$  es de menor magnitud en células provenientes de ratas tratadas con VE comparadas con células provenientes de animales en proestro, mientras que la inducción de la fosforilación de ERK no se modifica.

## **11. CONCLUSIÓN**

La principal conclusión que podemos formular es que los P2RY2 son regulados de manera diferencial en los animales control vs. los animales tratados con VE, esta regulación podría impactar el equilibrio proliferación-muerte en las células de la teca.

## **PERSPECTIVAS**

En las células de teca de animales tratados con VE proponemos que P2RY2 funciona de manera tónica y probablemente contribuye al mantenimiento del nivel de proliferación tecal durante el desarrollo del síndrome, sin embargo se requiere profundizar experimentalmente.

## 12. REFERENCIAS

- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Boeynaems, J.-M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., ... Weisman, G. A. (2006). International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy. *Pharmacological Reviews*, 58(3), 281–341. <http://doi.org/10.1124/pr.58.3.3>
- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Verkhratsky, A., & Zimmermann, H. (2009). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in Neurosciences*, 32(1), 19–29. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2008.10.001>
- Anesetti, G., & Chávez-Genaro, R. (2015). Neonatal testosterone exposure induces early development of follicular cysts followed by sympathetic ovarian hyperinnervation. *Reproduction, Fertility, and Development*. <http://doi.org/10.1071/RD14460>
- Bahr, J., Kao, L., & Nalbandov, A. V. (1974). The role of catecholamines and nerves in ovulation. *Biology of Reproduction*, 10(2), 273–290.
- Barria, A., Leyton, V., Ojeda, S. R., & Lara, H. E. (1993). Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology*, 133(6), 2696–2703. <http://doi.org/10.1210/endo.133.6.8243293>
- Bowler, W. b., Birch, M. a., Gallagher, J. a., & Bilbe, G. (1995). Identification and cloning of human P2U purinoceptor present in osteoclastoma, bone, and osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research*, 10(7), 1137–1145. <http://doi.org/10.1002/jbmr.5650100720>

- Brawer, J. R., Munoz, M., & Farookhi, R. (1986). Development of the polycystic ovarian condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat. *Biology of Reproduction*, 35(3), 647–655.
- Brawer, J. R., Naftolin, F., Martin, J., & Sonnenschein, C. (1978). Effects of a single injection of estradiol valerate on the hypothalamic arcuate nucleus and on reproductive function in the female rat. *Endocrinology*, 103(2), 501–512. <http://doi.org/10.1210/endo-103-2-501>
- Burnstock, G. (2007). Purine and pyrimidine receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 64(12), 1471–1483. <http://doi.org/10.1007/s00018-007-6497-0>
- Burnstock, G. (2013). Introduction and perspective, historical note. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 227. <http://doi.org/10.3389/fncel.2013.00227>
- Burnstock, G. (2014). Purinergic signalling: from discovery to current developments. *Experimental Physiology*, 99(1), 16–34. <http://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.071951>
- Burnstock, G., & Ralevic, V. (2014). Purinergic signaling and blood vessels in health and disease. *Pharmacological Reviews*, 66(1), 102–192. <http://doi.org/10.1124/pr.113.008029>
- Burnstock, G., & Verkhratsky, A. (2012). *Purinergic Signalling and the Nervous System*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Retrieved from <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-28863-0>
- Charlton, S. J., Brown, C. A., Weisman, G. A., Turner, J. T., Erb, L., & Boarder, M. R. (1996). PPADS and suramin as antagonists at cloned P2Y- and P2U-

- purinoceptors. *British Journal of Pharmacology*, 118(3), 704–710.  
<http://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15457.x>
- Chen, Z. P., Krull, N., Xu, S., Levy, A., & Lightman, S. L. (1996). Molecular cloning and functional characterization of a rat pituitary G protein-coupled adenosine triphosphate (ATP) receptor. *Endocrinology*, 137(5), 1833–1840.  
<http://doi.org/10.1210/endo.137.5.8612522>
- Comim, F. V., Teerds, K., Hardy, K., & Franks, S. (2013). Increased protein expression of LHCG receptor and 17 $\alpha$ -hydroxylase/17-20-lyase in human polycystic ovaries. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 28(11), 3086–3092.  
<http://doi.org/10.1093/humrep/det352>
- Corriden, R., & Insel, P. A. (2010). Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation. *Science Signaling*, 3(104), re1.  
<http://doi.org/10.1126/scisignal.3104re1>
- D'Albora, H., Anesetti, G., Lombide, P., Dees, W. L., & Ojeda, S. R. (2002). Intrinsic neurons in the mammalian ovary. *Microscopy Research and Technique*, 59(6), 484–489. <http://doi.org/10.1002/jemt.10231>
- Diamanti-Kandarakis, E., & Papavassiliou, A. G. (2006). Molecular mechanisms of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Trends in Molecular Medicine*, 12(7), 324–332. <http://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.05.006>
- Drury, A. N., & Szent-Györgyi, A. (1929). The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *The Journal of Physiology*, 68(3), 213–237.

- Dumesic, D. A., & Richards, J. S. (2013). Ontogeny of the ovary in polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, *100*(1), 23–38.  
<http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.02.011>
- Düsterberg, B., & Nishino, Y. (1982). Pharmacokinetic and pharmacological features of oestradiol valerate. *Maturitas*, *4*(4), 315–324.
- Edson, M. A., Nagaraja, A. K., & Matzuk, M. M. (2009). The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine Reviews*, *30*(6), 624–712.  
<http://doi.org/10.1210/er.2009-0012>
- Erb, L., Garrad, R., Wang, Y., Quinn, T., Turner, J. T., & Weisman, G. A. (1995). Site-directed Mutagenesis of P2U Purinoceptors POSITIVELY CHARGED AMINO ACIDS IN TRANSMEMBRANE HELICES 6 AND 7 AFFECT AGONIST POTENCY AND SPECIFICITY. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(9), 4185–4188.  
<http://doi.org/10.1074/jbc.270.9.4185>
- Erb, L., Liu, J., Ockerhausen, J., Kong, Q., Garrad, R. C., Griffin, K., ... Weisman, G. A. (2001). An RGD sequence in the P2Y(2) receptor interacts with alpha(V)beta(3) integrins and is required for G(o)-mediated signal transduction. *The Journal of Cell Biology*, *153*(3), 491–501.
- Fauser, B. C. J. M., Tarlatzis, B. C., Rebar, R. W., Legro, R. S., Balen, A. H., Lobo, R., ... Barnhart, K. (2012). Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. *Fertility and Sterility*, *97*(1), 28–38.e25.  
<http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.09.024>

- Freeman, M. E. (2006). Chapter 43 - Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. In J. D. N. M. P. W. P. R. G. C. M. de K. S. R. M. Wassarman (Ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)* (pp. 2327–2388). St Louis: Academic Press. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780125154000500488>
- Garrad, R. C., Otero, M. A., Erb, L., Theiss, P. M., Clarke, L. L., Gonzalez, F. A., ... Weisman, G. A. (1998). Structural basis of agonist-induced desensitization and sequestration of the P2Y2 nucleotide receptor. Consequences of truncation of the C terminus. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(45), 29437–29444.
- Gilling-Smith, C., Willis, D. S., Beard, R. W., & Franks, S. (1994). Hypersecretion of androstenedione by isolated thecal cells from polycystic ovaries. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 79(4), 1158–1165. <http://doi.org/10.1210/jcem.79.4.7962289>
- Gougeon, A. (2003). Chapter 2 - Dynamics of Human Follicular Growth: Morphologic, Dynamic, and Functional Aspects. In P. C. K. L. Y. Adashi (Ed.), *The Ovary (Second Edition)* (pp. 25–IV). San Diego: Academic Press. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124445628500033>
- Hennet, M. L., & Combelles, C. M. H. (2012). The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *The International Journal of Developmental Biology*, 56(10-12), 819–831. <http://doi.org/10.1387/ijdb.120133cc>
- Hillier, S. G., Whitelaw, P. F., & Smyth, C. D. (1994). Follicular oestrogen synthesis: the “two-cell, two-gonadotrophin” model revisited. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 100(1-2), 51–54.

- Ho, C. K. M., Christenson, L. K., & Strauss III, J. F. (2003). Chapter 6 - Intracellular Cholesterol Dynamics in Steroidogenic Cells. In P. C. K. L. Y. Adashi (Ed.), *The Ovary (Second Edition)* (pp. 93–110). San Diego: Academic Press. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124445628500070>
- Hoffmann, C., Ziegler, N., Reiner, S., Krasel, C., & Lohse, M. J. (2008). Agonist-selective, receptor-specific interaction of human P2Y receptors with beta-arrestin-1 and -2. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(45), 30933–30941. <http://doi.org/10.1074/jbc.M801472200>
- Hunzicker-Dunn, M., & Mayo, K. (2006). Chapter 14 - Gonadotropin Signaling in the Ovary. In J. D. N. M. P. W. P. R. G. C. M. de K. S. R. M. Wassarman (Ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)* (pp. 547–592). St Louis: Academic Press. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780125154000500191>
- Jacobson, K. A., Paoletta, S., Katritch, V., Wu, B., Gao, Z.-G., Zhao, Q., ... Kiselev, E. (2015). Nucleotides Acting at P2Y Receptors: Connecting Structure and Function. *Molecular Pharmacology*, 88(2), 220–230. <http://doi.org/10.1124/mol.114.095711>
- Jamnongjit, M., & Hammes, S. R. (2006). Ovarian Steroids: The Good, the Bad, and the Signals that Raise Them. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 5(11), 1178–1183.
- Jayasena, C. N., & Franks, S. (2014). The management of patients with polycystic ovary syndrome. *Nature Reviews. Endocrinology*, 10(10), 624–636. <http://doi.org/10.1038/nrendo.2014.102>
- Kaczmarek, E., Erb, L., Koziak, K., Jarzyna, R., Wink, M. R., Guckelberger, O., ... Robson, S. C. (2005). Modulation of endothelial cell migration by extracellular nucleotides:

involvement of focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathways. *Thrombosis and Haemostasis*, 93(4), 735–742.  
<http://doi.org/10.1267/THRO05040735>

Klein, C. M., & Burden, H. W. (1988). Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neuroscience Letters*, 85(2), 217–222.

Kukulski, F., Lévesque, S. A., & Sévigny, J. (2011). Chapter 9 - Impact of Ectoenzymes on P2 and P1 Receptor Signaling. In K. A. J. and J. Linden (Ed.), *Advances in Pharmacology* (Vol. 61, pp. 263–299). Academic Press. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123855268000096>

Lara, H. E., Ferruz, J. L., Luza, S., Bustamante, D. A., Borges, Y., & Ojeda, S. R. (1993). Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology*, 133(6), 2690–2695. <http://doi.org/10.1210/endo.133.6.7902268>

Lawrence, I. E., & Burden, H. W. (1980). The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *The Anatomical Record*, 196(1), 51–59.  
<http://doi.org/10.1002/ar.1091960106>

Legro, R. S., Arslanian, S. A., Ehrmann, D. A., Hoeger, K. M., Murad, M. H., Pasquali, R., ... Endocrine Society. (2013). Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: an Endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(12), 4565–4592. <http://doi.org/10.1210/jc.2013-2350>

Li, H., Wang, L., Qu, H., Yu, L., Burnstock, G., Ni, X., ... Ma, B. (2011). P2Y2 receptor-mediated modulation of estrogen-induced proliferation of breast cancer cells.

*Molecular and Cellular Endocrinology*, 338(1-2), 28–37.

<http://doi.org/10.1016/j.mce.2011.02.014>

Lustig, K. D., Shiao, A. K., & Brake, A. J. (1993). Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(11), 5113–5117.

Magoffin, D. A., & Erickson, G. F. (1988). Purification of ovarian theca-interstitial cells by density gradient centrifugation. *Endocrinology*, 122(5), 2345–2347.  
<http://doi.org/10.1210/endo-122-5-2345>

Malam-Souley, R., Seye, C., Gadeau, A.-P., Loirand, G., Pillois, X., Campan, M., ... Desgranges, C. (1996). Nucleotide receptor P2u partially mediates ATP-induced cell cycle progression of aortic smooth muscle cells. *Journal of Cellular Physiology*, 166(1), 57–65. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199601\)166:1<57::AID-JCP7>3.0.CO;2-F](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199601)166:1<57::AID-JCP7>3.0.CO;2-F)

March, W. A., Moore, V. M., Willson, K. J., Phillips, D. I. W., Norman, R. J., & Davies, M. J. (2010). The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 25(2), 544–551. <http://doi.org/10.1093/humrep/dep399>

Martínez-Ramírez, A. S., & Vázquez-Cuevas, F. G. (2015). Purinergic signaling in the ovary. *Molecular Reproduction and Development*.  
<http://doi.org/10.1002/mrd.22537>

Nelson-Degrave, V. L., Wickenheisser, J. K., Hendricks, K. L., Asano, T., Fujishiro, M., Legro, R. S., ... McAllister, J. M. (2005). Alterations in mitogen-activated protein kinase kinase and extracellular regulated kinase signaling in theca cells contribute

to excessive androgen production in polycystic ovary syndrome. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 19(2), 379–390. <http://doi.org/10.1210/me.2004-0178>

Nelson, V. L., Legro, R. S., Strauss, J. F., & McAllister, J. M. (1999). Augmented androgen production is a stable steroidogenic phenotype of propagated theca cells from polycystic ovaries. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 13(6), 946–957. <http://doi.org/10.1210/mend.13.6.0311>

Nelson, V. L., Qin, K. N., Rosenfield, R. L., Wood, J. R., Penning, T. M., Legro, R. S., ... McAllister, J. M. (2001). The biochemical basis for increased testosterone production in theca cells propagated from patients with polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(12), 5925–5933. <http://doi.org/10.1210/jcem.86.12.8088>

Nicholas, R. A., Watt, W. C., Lazarowski, E. R., Li, Q., & Harden, K. (1996). Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor. *Molecular Pharmacology*, 50(2), 224–229.

North, R. A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological Reviews*, 82(4), 1013–1067. <http://doi.org/10.1152/physrev.00015.2002>

Pandiella, A., Beguinot, L., Velu, T. J., & Meldolesi, J. (1988). Transmembrane signalling at epidermal growth factor receptors overexpressed in NIH 3T3 cells. Phosphoinositide hydrolysis, cytosolic Ca<sup>2+</sup> increase and alkalization correlate with epidermal-growth-factor-induced cell proliferation. *The Biochemical Journal*, 254(1), 223–228.

- Papadopoulos, V., & Miller, W. L. (2012). Role of mitochondria in steroidogenesis. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 26(6), 771–790.  
<http://doi.org/10.1016/j.beem.2012.05.002>
- Parr, C. E., Sullivan, D. M., Paradiso, A. M., Lazarowski, E. R., Burch, L. H., Olsen, J. C., ... Turner, J. T. (1994). Cloning and expression of a human P2U nucleotide receptor, a target for cystic fibrosis pharmacotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(8), 3275–3279.
- Schulster, A., Farookhi, R., & Brawer, J. R. (1984). Polycystic ovarian condition in estradiol valerate-treated rats: spontaneous changes in characteristic endocrine features. *Biology of Reproduction*, 31(3), 587–593.
- Shen, J., Seye, C. I., Wang, M., Weisman, G. A., Wilden, P. A., & Sturek, M. (2004). Cloning, up-regulation, and mitogenic role of porcine P2Y2 receptor in coronary artery smooth muscle cells. *Molecular Pharmacology*, 66(5), 1265–1274.  
<http://doi.org/10.1124/mol.104.002642>
- Smith, M. S., Freeman, M. E., & Neill, J. D. (1975). The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*, 96(1), 219–226. <http://doi.org/10.1210/endo-96-1-219>
- Tai, C. J., Kang, S. K., Cheng, K. W., Choi, K. C., Nathwani, P. S., & Leung, P. C. (2000). Expression and regulation of P2U-purinergic receptor in human granulosa-luteal cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(4), 1591–1597.  
<http://doi.org/10.1210/jcem.85.4.6558>

- Tai, C. J., Kang, S. K., Choi, K. C., Tzeng, C. R., & Leung, P. C. (2001). Antigonadotropic action of adenosine triphosphate in human granulosa-luteal cells: involvement of protein kinase Calpha. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(7), 3237–3242. <http://doi.org/10.1210/jcem.86.7.7691>
- Tai, C.-J., Kang, S. K., Tzeng, C.-R., & Leung, P. C. K. (2001). Adenosine Triphosphate Activates Mitogen-Activated Protein Kinase in Human Granulosa-Luteal Cells. *Endocrinology*, 142(4), 1554–1560. <http://doi.org/10.1210/endo.142.4.8081>
- Tsilchorozidou, T., Overton, C., & Conway, G. S. (2004). The pathophysiology of polycystic ovary syndrome. *Clinical Endocrinology*, 60(1), 1–17. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2265.2003.01842.x>
- Tu, M.-T., Luo, S.-F., Wang, C.-C., Chien, C.-S., Chiu, C.-T., Lin, C.-C., & Yang, C.-M. (2000). P2Y2 receptor-mediated proliferation of C6 glioma cells via activation of Ras/Raf/MEK/MAPK pathway. *British Journal of Pharmacology*, 129(7), 1481–1489. <http://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703182>
- Vázquez-Cuevas, F. G., Juárez, B., Garay, E., & Arellano, R. O. (2006). ATP-induced apoptotic cell death in porcine ovarian theca cells through P2X7 receptor activation. *Molecular Reproduction and Development*, 73(6), 745–755. <http://doi.org/10.1002/mrd.20447>
- Vázquez-Cuevas, F. G., Zárata-Díaz, E. P., Garay, E., & Arellano, R. O. (2010). Functional expression and intracellular signaling of UTP-sensitive P2Y receptors in theca-interstitial cells. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 8, 88. <http://doi.org/10.1186/1477-7827-8-88>

- Von Kügelgen, I., & Harden, T. K. (2011). Chapter 12 - Molecular Pharmacology, Physiology, and Structure of the P2Y Receptors. In K. A. J. and J. Linden (Ed.), *Advances in Pharmacology* (Vol. 61, pp. 373–415). Academic Press. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123855268000126>
- Walters, K. A., Allan, C. M., & Handelsman, D. J. (2012). Rodent models for human polycystic ovary syndrome. *Biology of Reproduction*, *86*(5), 149, 1–12. <http://doi.org/10.1095/biolreprod.111.097808>
- Wang, J., Liu, S., Nie, Y., Wu, B., Wu, Q., Song, M., ... Zhang, C. (2015). Activation of P2X7 receptors decreases the proliferation of murine luteal cells. *Reproduction, Fertility, and Development*. <http://doi.org/10.1071/RD14381>
- Westfall, D. P., Todorov, L. D., & Mihaylova-Todorova, S. T. (2002). ATP as a cotransmitter in sympathetic nerves and its inactivation by releasable enzymes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *303*(2), 439–444. <http://doi.org/10.1124/jpet.102.035113>
- Wickenheisser, J. K., Biegler, J. M., Nelson-Degrave, V. L., Legro, R. S., Strauss, J. F., & McAllister, J. M. (2012). Cholesterol side-chain cleavage gene expression in theca cells: augmented transcriptional regulation and mRNA stability in polycystic ovary syndrome. *PloS One*, *7*(11), e48963. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0048963>
- Wickenheisser, J. K., Nelson-DeGrave, V. L., & McAllister, J. M. (2006). Human ovarian theca cells in culture. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *17*(2), 65–71. <http://doi.org/10.1016/j.tem.2006.01.003>
- Wildman, S. S., Unwin, R. J., & King, B. F. (2003). Extended pharmacological profiles of rat P2Y2 and rat P2Y4 receptors and their sensitivity to extracellular H<sup>+</sup> and Zn<sup>2+</sup>

ions. *British Journal of Pharmacology*, 140(7), 1177–1186.

<http://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705544>

Yegutkin, G. G. (2008). Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*

- *Molecular Cell Research*, 1783(5), 673–694.

<http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.024>

### 13. LISTA DE ABREVIATURAS

**AC:** Adenilato ciclasa  
**ACh:** Acetil colina  
**Ado:** Adenosina  
**ADP:** Difosfato de adenosina  
**AMP:** Monofosfato de adenosina  
**AMPc:** Monofosfato de adenosina cíclico  
**ATP:** Trifosfato de adenosina  
**BSA:** Albúmina de suero bovino  
**Bz-ATP:** 3'-O-(4-benzoilo) benzoilo ATP  
**CL:** cuerpo lúteo  
**CGRP:** Péptido relacionado con el gen de la calcitonina  
**CYP17:** citocromo P450 17-hidroxilasa, 17,20-desmolasa  
**DAG:** Diacilglicerol  
**DAPI:** 4'6-diamino-2-fenilindol  
**DHEA:** dehidroepiandrostediona  
**E2:** estradiol  
**EC50:** Dosis efectiva media  
**EGFR:** Receptor del factor de crecimiento epidérmico  
**ERK 1/2:** cinasas reguladas por señales extracelulares  
**FA:** Folículo antral  
**FP:** Folículo primario  
**FS:** Folículo secundario  
**FSH:** Hormona folículo estimulante  
**GABA:** Ácido gamma-butírico  
**GnRH:** Hormona liberadora de gonadotropinas  
**GPCR:** Receptor acoplado a proteína G  
**hCG:** Gonadotropina coriónica humana  
**IP<sub>3</sub>:** Inositol trifosfato  
**LDL:** Lipoproteínas de baja densidad  
**LH:** Hormona luteinizante  
**LHR:** Receptor de la hormona luteinizante  
**MEK 1/2:** Cinasa  
**mRNA:** RNA mensajero  
**NA:** Noradrenalina  
**NPY:** Neuropeptido Y  
**P1:** Receptores purinérgicos tipo 1  
**P2:** Receptores purinérgicos tipo 2  
**P2RX** Receptores purinérgicos tipo 2X  
**P2RY:** Receptores purinérgicos tipo 2Y  
**P2RX7:** Receptor purinérgico P2RX7  
**P2RY2:** Receptor purinérgico P2RY2  
**P4:** Progesterona

**P450<sub>scc</sub>**: Complejo P450 side chain cleavage  
**PBS**: Buffer de fosfatos  
**PCOS**: Síndrome del ovario poliquístico  
**PFA**: Paraformaldehído  
**PIP<sub>2</sub>**: Fosfatidil inositol 4,5-bifosfato  
**PKA**: Proteína cinasa A  
**PKC**: Proteína cinasa C  
**PLC**: Fosfolipasa C  
**PVDF**: Polivinil  
**RT-PCR**: Reacción en cadena de la polimerasa con  
**SNC**: Sistema nervioso central  
**SON**: Nervio ovárico superior  
**SP**: Sustancia P  
**StAR**: Proteína reguladora aguda esteroideogénica  
**T**: Testosterona  
**TCs**: Células de la teca  
**TM**: Transmembranal  
**UDP**: Uridin difosfato  
**UTP**: Uridin trifosfato  
**VE**: Valerato de estradiol  
**VIP**: Péptido vasoactivo

## 14. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El desarrollo folicular en el ovario .....	4
Figura 2. Exudados vaginales obtenidos durante las fases del ciclo estral.....	5
Figura 3. Concentración de hormonas obtenidas en intervalos de 2 horas durante el ciclo estral de la rata .....	6
Figura 4. Síntesis de las hormonas esteroideas .....	8
Figura 5. Mecanismos de liberación del ATP .....	13
Figura 6. Receptores purinérgicos .....	14
Figura 7. Peso de las ratas control y las ratas tratadas con VE.....	30
Figura 8. Cortes transversales de ovarios control y VE .....	33
Figura 9. Concentración (ng/mL) de A) E2, B) P4 y C) T en el suero de ratas control en diestro-1, en estro y en ratas tratadas VE.....	34
Figura 10. Inmunodetección de la enzima StAR en células de la teca de rata ...	36
Figura 11. Expresión del receptor purinérgico P2RY2 .....	36
Figura 12. Movilización de Ca <sup>+2</sup> intracelular en las células de la teca.....	38
Figura 13. Efecto de la estimulación con UTP 100 µM en la fosforilación de ERK en células de la teca .....	39