

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN A ESTRADIOL SOBRE LA FUNCIÓN
REPRODUCTIVA EN LA RATA: CAMBIOS TEMPRANOS EN LA
EXPRESIÓN GENICA Y PARTICIPACIÓN DEL FACTOR DE
CRECIMIENTO NERVIOSO**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar
al grado académico de Doctor en Farmacología

Por

GONZALO ANDRÉS CRUZ NECULPÁN

Director de Tesis

Prof. Dr. Hernán E. Lara Peñaloza

Santiago - Chile
2011

Dedicado a Raúl Riquelme Méndez, quien me incentivó y motivó en los pasos iniciales del camino de la ciencia y a Cristina Saldías Porras, quien me ha acompañado a transitar por este camino.

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco a los integrantes del Laboratorio de Neurobioquímica de la Universidad de Chile, lugar en que he crecido enormemente tanto en la parte académica como personal. En particular al Dr. Hernán Lara, Dr. Alfonso Paredes y Dr. (c) Rafael Barra por participar directamente en las ideas y discusiones de este trabajo y al M.V. Daniel González y Claudia Arancibia por participar en la parte experimental.

Además, quiero agradecer a mis abuelos, Blanca Ortiz y Enrique Neculpán, mis hermanos, Raúl y Fidel, y mis amigos y/o compañeros de labores: Rafael Barra, Daniel González, Jorge Cubillos, Daniela Fernandois, Andrea Aliste, Francis Paz, Sergio Hernández, Ariel Díaz, Jonathan Martínez, El MASTER (Sr. Francisco Cortés), Paola Garrido, Fabián Jofré, Monika Greiner, Manuel Ricu, Sra. Rafaela.

Un especial agradecimiento a la Familia Saldias, en especial a Jaime Saldias V, Sara Porras y Cristina Saldias y además a María Isabel Casanueva por su incondicional apoyo.

FINANCIAMIENTO:

La realización de esta tesis fue financiada por proyectos de investigación y gracias a las becas de mantenimiento de las siguientes instituciones:

Proyectos del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT):

- *Proyecto FONDECYT N° 1090036 “Neonatal exposure to estradiol and stress in rats, activates neural genes and programs sympathetic nerve activity to determine changes in reproductive function and polycystic ovary syndrome ”*

Investigador Responsable: Dr. Hernán Lara.

Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT):

- *Beca de apoyo a la realización de tesis doctoral N° 20491032.*

Becario: Gonzalo Cruz

Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Chile:

- Beca de estadía corta de investigación destinada a estudiantes tesisistas de doctorado y magíster de la Universidad de Chile.

Becario: Gonzalo Cruz.

Proyecto MECESUP UCH-0704 Doctorado en Farmacología

- Beca de estadía corta de investigación destinada a estudiantes tesisistas de doctorado en Farmacología.

Becario: Gonzalo Cruz.

PRESENTACIONES A CONGRESOS:

Los resultados de esta tesis han sido presentados en los siguientes congresos científicos:

1) **Gonzalo Cruz**, Rafael Barra, Daniel González, Hernán Lara. **La exposición a estradiol programa daños irreversibles en el desarrollo folicular y capacidad ovulatoria sólo en una ventana de sensibilidad neonatal-infantil en la rata.** (Estradiol exposure programs irreversible damage in the follicular development and ovulation in a specific neonatal-infant sensitivity window in the rat).

XXI REUNIÓN ANUAL DE LA SOCIEDAD CHILENA DE REPRODUCCIÓN Y DESARROLLO. Comunicación oral, La Serena, Chile, 2010

2) **Gonzalo Cruz** y Hernán Lara. **La exposición a una dosis alta de estradiol durante la etapa neonatal infantil desarrolla la condición de ovario poliquístico (PCO) irreversible en la rata.** (The exposure to a single dose of estradiol during the neonatal-infantile developmental period induces an irreversible polycystic ovary condition in the rat)

XX REUNIÓN ANUAL DE LA SOCIEDAD CHILENA DE REPRODUCCIÓN Y DESARROLLO. Comunicación oral, La Serena, Chile, 2009

PUBLICACIONES:

1) Ramón Sotomayor, Michelle Tisavari, Gonzalo Cruz, Hernán Lara. **Neonatal exposure to single doses of estradiol or testosterone programs ovarian follicular development through an estradiol-mediated mechanism and develops polycystic ovary during adulthood in the rat.** Biology of reproduction 2011. Trabajo enviado. En revisión.

INDICE

INDICE	1
ABREVIATURAS	3
ABSTRACT	4
RESUMEN.....	6
INTRODUCCION	8
Antecedentes generales:	8
1) Regulación hormonal y nerviosa de la función ovárica	9
2) Participación de neurotrofinas en el desarrollo folicular temprano	9
3) Participación de la inervación simpática en el desarrollo folicular	11
4) Participación de la inervación simpática en el síndrome de ovario poliquístico	11
5) Concepto de “Programming”	13
HIPOTESIS	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVO ESPECÍFICO N° 1	14
OBJETIVO ESPECÍFICO N° 2	14
OBJETIVO ESPECÍFICO N° 3	15
MATERIAL Y METODOS	16
1) Animales y diseño experimental.	16
1.1) Grupos experimentales.	16
2) Procedimiento experimental.	17
2.1) Tratamiento con EV.....	17
2.2) Mantenimiento de los animales.....	17
2.3) Registro de la etapa del ciclo estral.	18
3) Análisis de las muestras.....	19
3.1) Morfología ovárica.	19
3.2) Homogenización de tejido ovárico	20
3.3) Cuantificación de NA	20
3.4) Determinación de la expresión génica por Microarray.....	21
3.5) Determinación de la expresión génica PCR en tiempo real.....	21
3.6) Cálculos, número muestral y análisis estadístico.....	23
RESULTADOS	25
1) Efectos a largo plazo de la exposición a EV en distintas edades	25
1.1 Cambios en la apertura vaginal y ciclicidad estral en ratas tratadas con EV a distintas edades y eutanasiadas a los 6 meses de vida	25
1.2 Efectos producidos por la administración de EV a distintas edades sobre el desarrollo folicular a los 6 meses de vida	27
1.2 Cambios en la concentración de noradrenalina ovárica en ratas tratadas con EV a distintas edades y eutanasiadas a los 180 días de vida	33
2) Efectos a corto plazo de la exposición neonatal a EV.....	34
2.1 Cambios en la expresión génica ovárica en ratas tratadas a edad neonatal con EV	34
2.2 Cambios en el desarrollo folicular y en el patrón de proliferación/apoptosis en ratas neonatas tratadas con estradiol el día 1 de vida y eutanasiadas 24 horas después	38

2.3 Acetilación de Histona H3 en ovarios de ratas neonatas tratadas con EV al día 1 de edad y sacrificadas 24 horas después	40
3) Efectos del bloqueo de NGF sobre la morfología ovárica y concentración de noradrenalina en ratas adultas tratadas con EV en la edad neonatal.....	44
DISCUSION	48
1) Efectos largo plazo de la exposición a EV en distintas edades sobre la fisiología reproductiva de la rata.	48
1.1 Cambios en la apertura vaginal y en la ciclicidad estral en ratas tratadas con EV a distintas edades y eutanasiadas a los 6 meses de vida.....	48
1.2 Efectos producidos por la administración de EV a distintas edades sobre el desarrollo folicular y la concentración de NA ovárica a los 6 meses de vida.	49
2) Efectos a corto plazo de la exposición neonatal a EV	54
3) Efectos del bloqueo de NGF sobre el ovario en ratas adultas tratadas con EV en la edad neonatal.....	58
CONCLUSIONES	62
REFERENCIAS	63
ANEXO 1.....	68
ANEXO 2.....	69

ABREVIATURAS

BDNF: Factor de crecimiento derivado de cerebro

EV: Valerato de estradiol

FSH: Hormona Folículo estimulante

GnRH: Factor liberador de gonadotrofinas

³HNE: Norepinefrina tritiada

HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento

LH: Hormona Luteinizante

NA: Noradrelanina

NGFB: Factor de Crecimiento Nervioso

NGFBAb: Anticuerpo policlonal contra NGFB

NGFR: Receptor de baja afinidad de NGFB (p75^{NTR})

NOS: Nervio ovárico superior

NT-3: Neurotrofina 3

NT4/5: Neurotrofina 4/5

NT6: Neurotrofina 6

PCO: Condición de Ovario Poliquístico (Ratas)

PCOS: Síndrome de Ovario Poliquístico (Humanos)

TRKA: Receptor de alta afinidad de NGFB

ABSTRACT

Ovarian function is under dual gonadotropic and neural control driven by gonadotropins and sympathetic nerves respectively. Estradiol Valerate (EV) single exposure to neonatal or adults rats develops a polycystic ovarian condition (PCO), which is preceded by an increased adrenergic tone and an increased concentration of Nerve Growth Factor (NGFB) and its low affinity receptor NGFR. A causal relationship between the nerve activity and PCO was demonstrated, since either the Superior Ovarian Nerve resection (SONX) or the blockade of NGFB with an antibody against the peptide reversed the polycystic condition in adult EV-treated rats. Previous work of our group have shown that the reversion occurs spontaneously in rats treated at different ages with the hormone, but it does not occur in rats are exposed to EV in the early life. Thus it is suggested that exists a developmental window in which estradiol produces irreversible damages in the reproductive system. Our aim was to determine this window of sensitivity to the deleterious effects of estradiol and the mechanism underlying this effect. We administered a single EV dose (10 mg/Kg) at different ages and the estrual cyclic activity was controlled until 6 month of life. At this age we analyzed the ovarian morphology and the noradrenaline (NA) ovarian concentration. We find that EV-treated rats at 1, 7 and 14 days old were acyclic during the whole period studied, and in addition they had a poor follicular development, anovulation and follicular cyst formation. In contrast, rats that were treated at days 21 and 30 of life recovered the estrual cyclic activity, the normal follicular development and the ovulatory capacity. In conclusion, the neonatal-infant period of life is the most sensitive period to the permanent damage produced by estradiol in the rat. Looking for the mechanism by which estradiol generates these effects, we performed a microarray to quantify the changes in the expression of neurotrophins, its receptors and related genes, 24h after estradiol exposure. Different changes in the expression of genes (particularly down-regulation) related to cell proliferation/differentiation and epigenetic regulations of gene expression were observed. We choose some genes specially affected and we did inmunohistochemistry against PCNA,

Hystone H₃ acetylated and TUNEL. Apparently there is an unbalance in the pattern of proliferation and differentiation in cells during the follicular assembly, a fact that has repercussion in the number of primary follicles. These results strongly suggest that rapid and early changes to the neurotrophin/receptors system, participates in the changes in follicular development found when rats were exposed neonatally to estradiol. Finally, and to verify if the primary increase in NGF was responsible for the permanent changes in follicular development, we administrated a policlonal antibody against NGFB during the first three days after birth to rats treated with EV the first day of age. The analysis of follicular development demonstrated that , in addition to a 90% decrease in NE concentration in the ovary and a increase in endogenous NGFB concentration, adults rats presented a further accumulation in precysts and cysts and in the preovulatory follicles strongly suggesting that the presence of increased levels of NGF during adulthood facilitates the conversion of antral follicles to cysts and because these rats did not recovered the ovulatory performance, there are probably mechanisms dependent of the presence of catecholamines (eg. ovulation) and other mechanism such us follicular development depend of NGF, strongly suggesting that ovary function is the results of coordinated regulation in which both sympathetic nerves and NGFB participates.

RESUMEN

La función ovárica es controlada por un eje endocrino y una regulación nerviosa paralela. La administración de valerato de estradiol (EV) a ratas produce una condición morfológica de ovario poliquístico (PCO) que está acompañada por un tono adrenérgico aumentado. Esta condición está precedida por el aumento del factor de crecimiento nervioso (NGFB) y su receptor, NGFR. La relación causal entre la actividad nerviosa y el desarrollo de PCO se demostró, ya que la disección del nervio ovárico superior (NOS) o la administración de anticuerpos contra NGFB producen la reversión de la condición de ovario poliquístico generada por EV en ratas adultas. Esta reversión ocurre a nivel de la dinámica folicular, ciclicidad estral y tono adrenérgico. Además de estos resultados evidencias preliminares muestran que la condición de PCO tiende a revertir en forma espontánea en estas ratas, sin embargo ésta no ocurre en la misma magnitud en ratas tratadas en la edad neonatal con EV, manteniéndose éstas acíclicas, sugiriendo una ventana en la cual estradiol produce efectos irreversibles en el control nervioso de la función ovárica. Nuestro objetivo fue determinar la ventana de mayor sensibilidad al tratamiento con EV y los cambios tempranos en NGFB/NGFR/TrkA, que programan la condición de ovario poliquístico en la rata de forma irreversible. Administramos EV a distintas edades (1, 7, 14, 21 y 30 días postnatal) y controlamos los ciclos estrales hasta los 6 meses de edad. En ese momento evaluamos la morfología ovárica y norepinefrina (NE) por HPLC. Encontramos que las ratas tratadas a los 1, 7 y 14 días de edad se mantenían acíclicas durante todo el periodo estudiado, lo que se condecía con un pobre desarrollo folicular, anovulación y presencia de quistes foliculares ováricos. En cambio las ratas que fueron tratadas a los 21 y 30 días de edad con EV recuperaron su ciclicidad estral, la capacidad ovulatoria, mostraban un patrón de desarrollo folicular similar al control. En conclusión la ventana de sensibilidad al efecto deletéreo permanente producido por EV corresponde a la etapa neonatal-infantil en la rata. Además nos propusimos buscar el mecanismo por el cual estradiol genera estos efectos. Para esto se realizó la técnica Microarray para

evidenciar los genes relacionados a neurotrofinas y receptores que cambian luego de la administración neonatal de EV. Encontramos que varios genes relacionados con proliferación celular, apoptosis, diferenciación y cambios epigenéticos inducidos por EV eran regulados a la baja. Según esto realizamos inmunohistoquímica y TUNEL para evidenciar que células están muriendo o proliferando y cuales están sujetas a cambios epigenéticos en el ovario neonatal de rata. Aparentemente, existe un desbalance en la conducta proliferativa y diferenciación de células implicadas en el ensamblaje folicular, lo que repercute en un menor número de folículos primarios en las ratas inyectadas con la hormona. Por último para verificar si el aumento de NGFB fue el responsable de los cambios permanentes producidos en el desarrollo folicular, administramos un anticuerpo policlonal contra NGFB durante los 3 primeros días de vida en ratas tratadas el día 1 de edad con EV. Al analizar el ovario a los 60 días de vida, además de una baja concentración de NA y NGFB elevado, existe un aumento de folículos antrales grandes y una acumulación de estructuras foliculares prequísticas y quísticas, sugiriendo que la presencia de niveles aumentados de NGFB durante la vida adulta facilita la conversión de estructuras preovulatorias en folículos quísticos. Además la ausencia de ovulación indica fuertemente que probablemente existen mecanismos dependientes de catecolaminas, como la ovulación, y otros mecanismos que dependen de NGFB, como el desarrollo folicular, que en forma fina y coordinada regulan la función ovárica.

INTRODUCCION

Antecedentes generales:

El desarrollo de la función ovárica en mamíferos es un proceso complejo que está compuesto de varias etapas. En primates humanos y no humanos al igual que en ovejas, el desarrollo de la glándula ovárica ocurre durante el período de vida prenatal. En la rata, nuestro modelo de estudio, si bien el desarrollo y maduración del ovario es un proceso que comienza en la etapa prenatal, el ensamblaje folicular ocurre los primeros días después del nacimiento. (Rajah et al., 1992; Kezele and Skinner, 2003). Después del ensamblaje folicular los folículos comienzan a desarrollarse y producir hormonas esteroidales hasta la adquisición de una competencia reproductiva óptima, que se alcanza en la pubertad. Después de la pubertad, cíclicamente se reclutan folículos para posteriormente madurar y generar un gameto competente. Todos los procesos nombrados anteriormente están estrictamente regulados por una gran cantidad de factores endocrinos y paracrinicos, entre ellos gonadotrofinas, factores de crecimiento y hormonas esteroidales. El hecho de que el proceso de maduración de los gametos esté influenciado por hormonas producidas por el tejido ovárico y que en forma paracrina o autocrina ejercen efectos reguladores, hacen a este sistema especialmente vulnerable a cambios funcionales por agentes externos como xenohormonas u hormonas esteroidales propias del organismo que llegan al individuo por contaminación externa o por defectos endógenos en su producción. En todos los casos ocurrirá que la exposición del individuo a concentraciones diferentes a las fisiológicas, producirá cambios en la función ovárica que pueden ser permanentes si esta exposición se realiza en periodos sensibles del desarrollo. En esta tesis, estudiamos los efectos de la administración de estradiol en distintas etapas del desarrollo ovárico, con el objetivo de encontrar la ventana de sensibilidad al tratamiento con estrógenos, en que esta hormona programa daños reproductivos irreversibles. Además, planteamos que cambios en la expresión génica de neurotrofinas, particularmente NGFB, sus receptores y genes relacionados participan en el

efecto deletéreo producido por estradiol en etapas tempranas del desarrollo.

1) Regulación hormonal y nerviosa de la función ovárica.

La fisiología reproductiva de los mamíferos está regulada por el eje hormonal Hipotálamo-Hipófisis-ovario, en donde la hipófisis responde a la GnRH liberada por el hipotálamo con secreción de sus propias hormonas, LH y FSH, las que modulan la foliculogénesis y esteroidogénesis en el ovario durante el ciclo reproductivo de los mamíferos.

Además del control endocrino de la función reproductiva, existe en forma paralela una regulación complementaria realizada mayormente por el eje Hipotálamo -Ganglio celiaco –ovario. El neurotransmisor que actúa en el ovario es principalmente la NA, cuyos sitios de liberación están ubicados en las terminales nerviosas de proyecciones neuronales que llegan a la teca de los folículos y provienen del Ganglio celiaco.(Lawrence and Burden, 1980; Ferruz et al., 1991; Lara et al., 2000; Forneris and Aguado, 2002)

2) Participación de neurotrofinas en el desarrollo folicular temprano

Las neurotrofinas se producen en diversos tejidos que son blancos de inervación. La función clásica de las neurotrofinas es el soporte y mantenimiento de las fibras nerviosas que llegan al tejido. Existen 5 neurotrofinas identificadas; NGFB (factor de crecimiento nervioso), BDNF (factor de crecimiento nervioso derivado de cerebro), NT-3(Neurotrofina 3), NT-4/5(Neurotrofina 4/5) y NT- 6 (neurotrofina 6), de las cuales todas se expresan en el ovario, en distintas etapas del desarrollo folicular (Dissen et al., 1995). Además de esto, células no neuronales del ovario expresan los receptores de alta afinidad para neurotrofinas (trk A, trk B, trkC) y el receptor de baja afinidad (NGFR), lo que atribuye a las neurotrofinas funciones paracrinas independientes del sistema nervioso (Dissen et al., 1995).

Dissen y cols. (Dissen et al., 1995) encontraron que NGFB y *trk A* disminuyen su expresión en el ensamblaje folicular en el ovario de rata, lo que sugiere que esta señal puede influenciar en los procesos de diferenciación celular del ovario, ya que antes de este evento hay una alta tasa de proliferación de

células mesenquimales que es reducida al momento del ensamblaje folicular (Ojeda et al., 2000). Por el contrario, NGFR aumenta su expresión en este periodo, sugiriendo también la participación en esta etapa del desarrollo neonatal. Además la detección inmunocitoquímica de NGFR en células del estroma ovárico de fetos de 22 semanas pero no en adultos sugiere un rol de NGFB en el desarrollo folicular temprano en ovario en humano (Abir et al., 2005). Otra evidencia de la función de NGFB en el desarrollo folicular es la participación de esta neurotrofina en la adquisición de receptores de FSH por los folículos recién formados (Romero et al., 2002). Para una mayor revisión del papel de las neurotrofinas en la foliculogénesis ver referencia (Dissen et al., 2004a).

El bloqueo de NGFB en la etapa neonatal, mediante anticuerpos monoclonales inyectados vía subcutánea, provoca alteraciones reproductivas como el retraso en la primera ovulación y estancamiento del desarrollo folicular (Lara et al., 1990). Por el contrario, el aumento de la expresión de NGFB y NGFR (Sotomayor-Zarate et al., 2008) inducido por estradiol, produce un adelantamiento de la pubertad y ovario poliquístico en la adultez. Creemos que el bloqueo de NGFB después de la administración de EV revertirá parte de los efectos reproductivos producidos por EV. El aumento de NGFB en respuesta a la administración de estradiol ha sido explicado por elementos de respuesta a estradiol para NGFB o NGFR que están presentes en el ADN (Toran-Allerand, 1996).

Se ha demostrado que poco después del trasplante del ovario a un sitio ectópico, NGFB aumenta en el ovario provocando una completa reinervación en 21 días aproximadamente (Lara et al., 1991). Sin embargo, el efecto de este aumento de NGFB parece ser importante para la función reproductiva sólo en la etapa neonatal, ya que la denervación mecánica del NOS, aunque siempre produce aumento en NGFB en el ovario, solo produce alteraciones en la ciclicidad estral cuando se realiza a los pocos días postnatal, a diferencia de cuando se realiza en la etapa adulta en que no se ve afectada la ciclicidad estral (Lara et al., 1993; Rosa et al., 2003).

3) Participación de la inervación simpática en el desarrollo folicular

Se ha demostrado que existen fibras nerviosas noradrenérgicas en el ovario desde etapas tempranas del desarrollo postnatal, e inclusive desde antes del nacimiento (Malamed et al., 1992). Además, se ha atribuido roles a diversos neurotransmisores en el desarrollo folicular (Mayerhofer et al., 1997). Recientemente (Ricu et al., 2008) se demostró que las fibras nerviosas ováricas alcanzan su madurez en un periodo cercano a la pubertad, ya que aunque están presentes y pueden incorporar ^3HNE desde el nacimiento, solamente son capaces de liberar la ^3HNE desde la pubertad, bajo un estímulo con K^+ y dependiente de calcio.

La resección neonatal del NOS produce alteraciones reproductivas como retraso en la pubertad y aciclicidad estral (Forneris and Aguado, 2002), sin embargo si la resección del NOS ocurre en la etapa adulta no produce aciclicidad estral (Lara et al., 1993; Rosa et al., 2003). Por otra parte, resultados no publicados de nuestro laboratorio muestran que la administración neonatal de Isoproterenol, un agonista beta- adrenérgico, provoca adelantamiento de la pubertad y aciclicidad estral en el periodo cercano a la pubertad. Nosotros planteamos que la administración de EV en el periodo neonatal será capaz de programar una activación nerviosa permanente del ovario manteniendo la condición de ovario poliquístico durante todo el periodo reproductivo de la rata.

4) Participación de la inervación simpática en el síndrome de ovario poliquístico.

El Síndrome de Ovario poliquístico (PCOS) es la patología ovárica más frecuente en mujeres en edad reproductiva y es caracterizada por anovulación, hirsutismo, hiperandrogenismo, amenorrea, infertilidad (Balen and Rajkowha, 2003). Los criterios diagnósticos del PCOS fueron redefinidos en la reunión internacional de Rotterdam (Broekmans et al., 2006), donde se acordó en que este síndrome está presente si existen al menos dos de los tres criterios siguientes: irregularidades menstruales, signos bioquímicos o clínicos de

exceso de andrógenos y morfología de ovario poliquístico. Además, se reconoce que la resistencia a la insulina y la elevación de los niveles plasmáticos de LH son características comunes de esta enfermedad y que las pacientes tienen un riesgo elevado de Diabetes Mellitus Tipo-II y de eventos cardiovasculares (The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group, 2004). Es en este sentido, diversos grupos de investigación, se encuentran estudiando los mecanismos fisiopatológicos que serían responsables del desarrollo y perpetuación del PCOS. Actualmente se utilizan varios modelos animales para estudiar la etiología de este síndrome y es en esta dirección que nuestro grupo ha centrado la investigación en el estudio del componente nervioso intraovárico que pudiese desencadenar la condición quística (Lara et al., 1993; Lara et al., 2000; Lara et al., 2002). Uno de los modelos animales que utilizamos en nuestro laboratorio para producir una condición tipo ovario poliquístico, es la administración de una dosis única de EV en ratas hembras de edad reproductiva. En este modelo experimental, desarrollado por Brawer y cols. (Brawer et al., 1978), observamos que la administración de EV a ratas adultas (Lara et al., 1993) y prepúberes (Rosa et al., 2003) y neonatas (Sotomayor-Zarate et al., 2008) produjo alteraciones reproductivas relacionadas con la activación de los nervios simpáticos ováricos y aumento del contenido de NA intraovárica.

La relación causal entre aumento de la actividad simpática y el desarrollo de quistes ováricos se comprobó ya que la desnervación quirúrgica del nervio ovárico superior (NOS) logró revertir tanto la aciclicidad como la condición anovulatoria inducida por EV. (Lara et al., 1993; Greiner et al., 2005), A nivel endocrino, nuestro modelo de administración de valerato de estradiol (EV) en ratas hembras prepúberes (Rosa et al., 2003), nos permitió observar un aumento en la actividad de la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, la enzima limitante de la síntesis de andrógenos ováricos, sugiriendo fuertemente una condición hiperandrogénica similar a la observada en el PCOS humano. Por otro lado, estudios de nuestro grupo de investigación usando Isoproterenol, un agonista adrenérgico, como también un modelo de activación adrenérgica por

estrés por frío crónico, han comprobado que una hiperestimulación simpática ovárica genera la condición poliquística ovárica en ratas. En el caso de la hiperestimulación adrenérgica producida en el modelo de inducción de ovario poliquístico por administración de EV, se ha demostrado que un aumento de NGFB sería el responsable de incrementar tanto la densidad de fibras nerviosas ováricas como su actividad en ratas adultas.

5) Concepto de “Programming”

El concepto de “programming”, definido por Lucas (Lucas, 1991), corresponde al cambio de una configuración fisiológica producida por un estímulo o injuria durante un periodo crítico en el desarrollo, que resulta en efectos deletéreos en la vida adulta. La importancia de este concepto radica en que durante el desarrollo, existen periodos críticos de vulnerabilidad (“ventanas específicas de sensibilidad”) para condiciones adversas (ej.: Exceso o deficiencia de hormonas, nutrientes, vitaminas o condiciones fisiopatológicas como elevada presión sanguínea) y que pueden ocurrir a diferentes tiempos específicos para diferentes órganos (Lucas, 1991). Dado que en humano se ha demostrado que PCOS se desarrolla desde antes de la pubertad, nosotros creemos que este es el mecanismo que está involucrado en el desarrollo de ovario poliquístico en la rata y también que puede ser una de las causas del síndrome de ovario poliquístico en la mujer. Interesantemente, podría ser a través de contaminantes ambientales secundarios a la producción industrial de materiales, compuestos estrogénicos sintéticos como anticonceptivos o una elevada concentración de estrógeno debido a alguna patología.

En resumen:

- La exposición a EV en distintas edades en la rata produce ovario poliquístico en la vida adulta.
- Existen ventanas de sensibilidad o vulnerabilidad a los efectos hormonales.
- Las Neurotrofinas e inervación simpática participan en el desarrollo folicular.
- El aumento de NGFB y NA participan en la inducción de PCO por estradiol.

El conjunto de estos antecedentes nos permiten plantear la siguiente hipótesis:

HIPOTESIS

La hipótesis de trabajo planteada en esta tesis es la siguiente:

“Existe una ventana de sensibilidad al tratamiento con estrógenos, en que esta hormona programa una activación nerviosa ovárica, provocando daños reproductivos irreversibles en la rata, siendo el NGFB uno de los factores desencadenantes”

OBJETIVO GENERAL

Como objetivo general de esta tesis planteamos lo siguiente:

“Determinar la ventana de mayor sensibilidad al tratamiento con EV y los cambios tempranos en NGFB/NGFR/TrkA, que programarían en este periodo una sobreactivación nerviosa capaz de mantener la condición de ovario poliquístico en la rata adulta”

OBJETIVO ESPECÍFICO N° 1

“Determinar la etapa del desarrollo postnatal en que la administración de estradiol provoca cambios neuroendocrinos y morfológicos permanentes a nivel del ovario”.

- Analizar la morfometría de los folículos ováricos a los 180 días de vida en ratas que han sido tratadas con EV en distintas edades del desarrollo.
- Determinar la concentración de hormonas esteroidales a los 180 días de vida en ratas que han sido tratadas con EV en distintas edades del desarrollo.
- Determinar la concentración de noradrenalina ovárica a los 180 días de vida en ratas que han sido tratadas con EV en distintas edades del desarrollo.

OBJETIVO ESPECÍFICO N° 2

“Determinar los cambios tempranos en la expresión neurotrofinas, sus receptores y otros genes relacionados, que ocurren después de la exposición a estradiol y verificar su importancia en la inducción de PCO en la rata.”.

- Realizar un “screening” dirigido a cuáles son los genes relacionados con Neurotrofinas que cambian tempranamente (24 horas post EV) después de la exposición a estradiol mediante la técnica de Microarray.

- Comprobar los cambios en la expresión génica por la técnica de PCR en tiempo real.
- Realizar inmunohistoquímica para proteínas relacionadas con los cambios de expresión génica vistos en el Microarray.

OBJETIVO ESPECÍFICO Nº 3

“Determinar si existe una relación causal entre el aumento de NGFB y la inducción de ovario poliquístico por administración de EV en la etapa neonatal de la rata”

- Analizar la morfometría de los folículos ováricos a los 60 días de vida en ratas que han sido tratadas con EV + NGFBAb en los primeros días de vida.
- Determinar la concentración de hormonas esteroideas a los 60 días de vida en ratas que han sido tratadas con EV + NGFBAb en los primeros días de vida.
- Determinar la concentración de NGFB y noradrenalina ovárica a los 60 días de vida en ratas que han sido tratadas con EV + NGFBAb en los primeros días de vida.

MATERIAL Y METODOS

1) Animales y diseño experimental.

Para el desarrollo de esta tesis se usaron ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley provenientes del bioterio de animales de experimentación de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Los protocolos de experimentación realizados en esta tesis fueron aprobados por los comités de bioética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile y de la Comisión Nacional de Investigación, Ciencia y Tecnología (CONICYT).

1.1) Grupos experimentales.

1.1.1) Objetivo 1: Animales estrogenizados los días 1, 7, 14, 21 y 30 post natal y que se eutanasiaron el día postnatal 180. Para los experimentos a largo plazo se usaron 30 ratas neonatas hembras de 1 día de edad. Se consideró 5 ratas neonatas por cada grupo experimental, separando las ratas en los siguientes grupos: EV1, EV7, EV14, EV21, EV30 y control. El objetivo de estos experimentos fue estudiar los efectos producidos por la estrogenización neonatal en la vida adulta de los animales, caracterizando parámetros de función reproductiva (Ej. ciclicidad estral, apertura vaginal) y cambios bioquímicos intra y extraováricos (Ej. esteroides sexuales plasmáticos, contenido de NA ovárico).

1.1.2) Objetivo 2: Animales estrogenizados el día 1 postnatal y que fueron eutanasiados a las 24 y 48 post inyección de EV. Para estos experimentos utilizamos 108 ratas neonatas hembras, divididos en 2 series experimentales: la primera serie de 60 ratas, 30 inyectadas con EV el día 1 de vida y eutanasiadas 24 horas después. El objetivo de estas series experimentales fue estudiar los efectos agudos de EV sobre los ARNm de NGFB y una gran cantidad de genes relacionados mediante la técnica de microarray. Además, se realizó inmunohistoquímica contra diversos marcadores en los ovarios contralaterales.

1.1.3) Objetivo 3: Animales estrogenizados el día 1 post natal y que se eutanasiaron el día postnatal 60. Para esta serie experimental se usó 15 ratas neonatas hembras de 1 día de edad. Se consideró 5 ratas neonatas por cada grupo experimental, separando las ratas en los siguientes grupos: EV1, EV1+NGFBAb y control. El objetivo de este experimento fue estudiar si el bloqueo de NGFB bloquea los efectos producidos por la estrogenización neonatal en la vida adulta de los animales, caracterizando parámetros de función reproductiva (Ej. ciclicidad estral, apertura vaginal) y cambios bioquímicos intra y extraováricos (Ej. esteroides sexuales plasmáticos, contenido de NA ovárico).

2) Procedimiento experimental.

2.1) Tratamiento con EV.

El tratamiento neonatal con EV (Sigma St. Louis, MO) fue realizado a través de la administración subcutánea de una dosis única durante las primeras 24 horas de vida (EV1), a los 7 días de vida (EV7), a los 14 días de vida (EV21) y a los 30 días de vida (EV30) de los animales. La dosis utilizada fue 10 mg/Kg de peso corporal, en 50 µL de aceite de sésamo (Sigma St. Louis, MO.) Los controles solo recibieron el vehículo de disolución del fármaco.

2.2) Mantención de los animales.

Después de la administración del fármaco, las ratas permanecieron con sus respectivas nodrizas hasta los 21 días de edad, fecha en la cual se destetaron y separaron en un máximo de 3 animales por jaula. Durante todo el tiempo de mantención, los animales estuvieron expuestos a ciclos luz-oscuridad de 12 horas, con alimento y agua *ad libitum*. Durante el período de vida de los animales se registró la frecuencia y la etapa del ciclo estral de la rata. La apertura vaginal fue registrada como el día en el cual se pudo observar el canal vaginal y da cuenta del inicio de la etapa puberal de los animales.

Una vez finalizada las series experimentales las ratas fueron sacrificadas por decapitación, recolectando sangre para la determinación de progesterona, $\Delta 4$ -

androstenediona y E₂. Se extrajeron los ovarios, los cuales fueron congelados inmediatamente y almacenados a -80°C para análisis posteriores.

2.3) Registro de la etapa del ciclo estral.

El registro diario de ciclicidad estral fue realizado a contar de la fecha de apertura vaginal de los animales y basados en las características citológicas que adopta el epitelio vaginal por efecto de los niveles circulantes de hormonas sexuales esteroidales y que caracterizan las etapas periovulatorias (Marcondes et al., 2002):

- **Proestro:** Etapa del ciclo estral de la rata de duración entre 12 a 24 horas y que citológicamente se caracteriza por presencia de células epiteliales nucleadas, bien redondeadas y solo algunas escamosas de forma irregular.
- **Estro:** Etapa del ciclo estral de la rata de duración entre 24 a 48 horas. Es el periodo de receptividad sexual por el macho. Citológicamente se caracteriza por presencia de células escamosas (con citoplasma granular), de forma irregular y agrupadas.
- **Metaestro o Diestro 1:** Duración de 12 a 24 horas. Presencia en el frotis de leucocitos y células escamosas.
- **Diestro 2:** Etapa del ciclo estral con una duración aproximada de 48 horas y con alta presencia en el frotis de leucocitos.

3) Análisis de las muestras.

3.1) Morfología ovárica.

Para realizar análisis morfométrico de las distintas poblaciones foliculares del ovario, después de la extracción del tejido, éste fue inmerso inmediatamente en fijador Bouin (mezcla formada por *p*-formaldehído al 37-40%, ácido pícrico saturado y ácido acético glacial), donde permanecieron por 6-48 horas y luego lavados en etanol 70% por 24 horas. Después del procedimiento de fijación, los ovarios fueron incluidos en parafina, cortados a un grosor de 8 μ m y sujetos a tinción con hematoxilina-eosina. Para realizar el análisis morfométrico se utilizaron los criterios previamente publicados por nuestro laboratorio (Paredes et al., 1998; Lara et al., 2000) y que nos permitió analizar las poblaciones de folículos primordiales, primarios, preantrales, antrales, folículos atrésicos, prequistes, quistes y cuerpos lúteos. A continuación se señalan los criterios principales para cuantificar la población folicular: a) Folículos primordiales: fueron aquellos en que el ovocito está rodeado por células de la granulosa de forma aplanada; b) Folículos primarios: fueron aquellos en que el ovocito estaba rodeado por una o dos capas de células de granulosa de forma cuboidal; c) Folículos preantrales: también son clasificados como folículos secundarios. No presentan cavidad antral y el ovocito está rodeado por más de dos capas de células de granulosa cuboidales; d) Folículos antrales: fueron cuantificados cuando el núcleo del ovocito fue visualizado y estaba rodeado por varias capas de células de la granulosa cuboidales. En estos folículos está presente una cavidad antral y las células de la granulosa tienen apariencia normal; e) Folículos preantrales y antrales atrésicos: estos folículos fueron clasificados por los criterios anteriores (c y d), sin embargo se pudo identificar más del 5% de células con núcleo picnótico en la sección cruzada mayor del folículo. Otro criterio de atresia fue el hallazgo de ovocitos deformes, fragmentos de ovocitos flotando en la cavidad antral, células de granulosa y teca no identificables, y quiebres de la vesícula germinal; f) Folículos prequísticos: fueron folículos de gran tamaño, sin presencia de ovocito u

ovocito deforme y desnudo. Estos folículos presentaron capa de células técas aparentemente normal, seguidas por 4 o 5 capas de células de granulosa densamente empaquetadas alrededor de la gran cavidad antral; g) Folículos Quísticos: son folículos desprovistos de ovocito con una gran cavidad antral. Presentan células de la teca bien definidas y una delgada capa de células de granulosa de apariencia sana (Lara et al., 2000).

3.2) Homogenización de tejido ovárico

El ovario contralateral (respecto al usado para análisis morfométrico) fue recolectado en hielo e inmediatamente almacenado a -80°C para el ensayo de determinación del contenido de NA intraovárica. El ovario utilizado fue pesado y homogenizado en 4 volúmenes de buffer DPBS (Dulbecco Phosphate Buffered Saline) cuya composición es la siguiente: KCl [2,68mM], NaCl [136,89mM], KH_2PO_4 [1,47mM], Na_2HPO_4 [8,10mM], $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ [0,90mM] and $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ [0,49mM]. El homogenizado obtenido fue dividido en dos alícuotas iguales. Una de estas alícuotas fue almacenada a -80°C para la determinación de NGFB, mientras que la otra fue precipitada con ácido perclórico (PCA) 1,2N y luego centrifugada a 13.000 g por 10 min a 4°C . El sobrenadante obtenido fue separado y filtrado (0,2 μm dispositivo de filtro, SM16534, Minisart NML, Sartorius) para ser usado en la determinación del contenido de NA del ovario.

3.3) Cuantificación de NA

3.3.1) Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detección electroquímica: Veinte μL de cada solución filtrada fueron inyectadas en un sistema de cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplado a un detector electroquímico (HPLC-EC) con la siguiente configuración: Inyector Rheodyne, una bomba Waters multisolvente (Modelo 600-E, Waters, Millipore Corporation, Milford, MA), una columna BAS (Modelo MF-6213, fase II ODS-3, Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN) y un detector electroquímico de pulso (Modelo 464, Waters, Millipore Corporation, Milford, MA).

La fase móvil del HPLC-EC utilizada para la determinación de NA fue la

siguiente: 0,1 M de NaH₂PO₄, 0,86 mM de Octil-Sulfato, 1 mM de EDTA y 0,5% v/v de acetonitrilo (ajustado a pH 2,6) (Dorfman et al., 2003; Sotomayor et al., 2005). Las condiciones de detección fueron: Potencial amperométrico de oxidación de 0,650 V, sensibilidad de detección 1 nA y flujo de fase móvil de 1 mL/min.

3.4) Determinación de la expresión génica por Microarray.

Se utilizó el kit GEArray de SABioscience, de los cuales se eligió el que corresponde a Neurotrofinas y Receptores. En resumen se generó ARN complementario (ARNc) con UTP biotinilado a partir de nuestras muestras de ARN total, las que se hibridaron con secuencias complementarias de ADNc dispuestos en una membrana y correspondientes a los genes que queríamos evaluar. La detección fue quimioluminiscente mediante un sistema biotina-streptavidina, y los resultados se expresan de la siguiente forma:

Intensidad de señal de gen de interés (control)/ Intensidad de señal de blanco (control): Intensidad de señal de gen de interés (EV)/ Intensidad de señal de blanco (EV). Según los criterios utilizados, un valor mayor o igual a 2 corresponde a una regulación a la baja de un gén determinado producto de la exposición a EV y un valos menor o igual a 0,5 corresponde a una regulación a la alza de un gen determinado producto de la exposición a EV.

3.5) Determinación de la expresión génica PCR en tiempo real.

Para determinar los cambios en la expresión de *ngfb*, *ngfr*, *ncoa-1*, *tgfa*, *stat3* y *jun* en el ovario después de las primeras 72 hrs post inyección de EV, se cuantificó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcriptasa reversa (RT-PCR) en tiempo real. En primer lugar se extrajo el ARN total por el método de Chomczynski y Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987), luego 5 µg de ARN de cada una de las muestras se sometieron a la reacción de transcripción reversa para obtener ADNc. La reacción se llevó a cabo a 42°C por 60 min usando 1,6 mM dNTPs, 10 mM DTT, 176 nM partidores randomizados (Invitrogen, Carlsbad, CA), 25 U RNasaOUT (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 125 U de transcriptasa reversa SuperScript II

(Invitrogen, Carlsbad, CA). La reacción se detuvo por calentamiento de las muestras a 75°C por 10 min.

Posteriormente los ADNc obtenidos se amplificaron mediante la PCR en tiempo real, en presencia de partidores específicos para cada uno de genes de interés. Para cuantificar el ARNm de *Ngfb* y *Ngfr*, todas las muestras fueron analizadas en triplicado, utilizando para cada una de ellas un volumen de reacción de 20 µL: 12,5µL de 2X Brilliant® Platinum SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene®, 1834 State Hwy. 71 West) + 7,2µL de agua estéril nanopura + 0,4 µL de cada uno de los partidores y 2µL de ADNc. Después de iniciada la activación de la polimerasa a 95°C por 10 min se realizó un protocolo de amplificación estándar de 40 ciclos en el termociclador MJ Research PCR tiempo real (MJ Research, modelo PT-200, Inc., Watertown, MA).

Las condiciones de cada ciclo de reacción para cada gen se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 1: Condiciones de reacción de PCR para los distintos genes analizados. Se muestra por cada gen la duración y temperatura utilizada en las distintas fases de cada ciclo de amplificación.

Gen		Alineación	Elongación	Cuantificación
<i>18s</i>	95°C x20 seg	60°Cx 15 seg	72°Cx20 seg	74°Cx0,06seg
<i>ngfb</i>	95°Cx20 seg	60°Cx 15 seg	72°Cx20 seg	74°Cx0,06seg
<i>ngfr</i>	95°Cx20 seg	60°Cx 15 seg	72°Cx20 seg	74°Cx0,06seg
<i>tgfa</i>	95°Cx20 seg	63°Cx 15 seg	72°Cx20 seg	74°Cx0,06seg
<i>Ncoa1</i>	95°Cx20 seg	64°Cx 15 seg	72°Cx20 seg	74°Cx0,06seg
<i>Stat3</i>	95°Cx20 seg	64°Cx 15 seg	72°Cx20 seg	74°Cx0,06seg
<i>Fus</i>	95°Cx20 seg	60°Cx 15 seg	72°Cx20 seg	74°Cx0,06seg
<i>Jun</i>	95°Cx20 seg	60°Cx 15 seg	72°Cx20 seg	74°Cx0,06seg
<i>Ngfrap1</i>	95°Cx20 seg	55°Cx 15 seg	72°Cx20 seg	74°Cx0,06seg

La intensidad de fluorescencia de la doble hebra específica SYBR-Green I, muestra la cantidad realmente formada del producto de PCR y que es leída al final de cada paso de la elongación. Para determinar la especificidad del producto formado se realizó una “curva de melting” entre 72-85°C bajo medición continua de fluorescencia, donde cada uno de los productos PCR

amplificados tuvo una única temperatura de desapareamiento (melting point). La cantidad de ARNm inicial de cada gen de interés fue calculada determinando el ciclo en el cual comenzó el aumento lineal del producto de PCR. Este valor de ciclo se interpoló en una curva estándar obtenida por diluciones seriadas de una muestra de concentración conocida.

Los partidores para cada gen se muestran en la tabla 2:

Tabla 2: Partidores utilizados en reacción de PCR para los distintos genes analizados. Se muestra los distintos partidores utilizados para los genes analizados en esta tesis.

Gen	Forward	Reverse
<i>18s</i>	5'-TCAAGAACGAAAGTCGGAGG-3'	5'-GGACATCTAAGGGCATCACA-3'
<i>ngfb</i>	5'-GGCCCATGGTACAATCTCCTTCAA -3'	5'-GTCCGTGGCTGTGGTCTTATCTCC -3'
<i>ngfr</i>	5'-AGCCAACCAGACCGTGTGTGA -3'	5'-GTCCTGGCAGGAGAACACGAG-3'
<i>tgfa</i>	5'-ACTCTGGGTACGTGGGTGTTTCG-3'	5'-GGTTGTACATTGAGGGGGAAGGTC-3'
<i>Ncoa1</i>	5'-TTGCCAGCGCTATGAAGTAATG-3'	5'-GCCCACTGTGCTCCCTGTC-3'
<i>Stat3</i>	5'-TCAGATCACATGGGCTAAGTTTTG-3'	5'-CTTGGGAATGTCAGGGTAGAGGTA-3'
<i>Fus</i>	5'-CCCTATGGCCAGCAGAGTTACA-3'	5'-AGGACTGCTGCCATAAGAAGACT-3'
<i>Jun</i>	5'-CGACGTCGGGCTGCTCAA-3'	5'-GTGCCGCGGAGGTGACA-3'

3.6) Cálculos, numero muestral y análisis estadístico.

Los resultados fueron expresados como valor promedio \pm error estándar medio (EEM). Las figuras que muestran curso temporal fueron analizadas por análisis de varianza de una cola (ANOVA) seguido por un post test Newman-Keuls de comparación de medias. Las diferencias entre el grupo control y tratamiento fueron analizadas por test-*t* de *student's* no-pareado y la diferencia estadísticamente significativa se estableció cuando el valor de *p* fue menor que 0,05. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

El número de animales por cada objetivo se detalla a continuación:

Objetivo 1:

Morfología: EV1 (n=5), EV7 (n=4), EV14 (n=5), EV21 (n=5), EV30 (n=4), control (n=5)

Determinación de NA: EV1 (n=5), EV7 (N=4), EV14(n=5), EV21 (n=5), EV30 (n=5), control (n=6)

Objetivo 2:

Microarray: EV (n=1), Control (n=1), siendo "n = 1" un pool de 6 ovarios.

PCR en tiempo real: EV (n=4), control (n=4) siendo "n = 1" un pool de 6 ovarios.

Inmunohistoquímica: EV (n=3-4), control (n=4-5) se muestran fotos representativas.

Recuento de folículos primarios: EV(n=6), control (n=7), se realiza recuento de folículos cada 5 cortes y se calcula el número de folículos dividido por corte.

Objetivo 3:

Morfometría: EV (n=5), EV+NGFAB (n=5), control (n=5)

RESULTADOS

1) Efectos a largo plazo de la exposición a EV en distintas edades

1.1 Cambios en la apertura vaginal y ciclicidad estral en ratas tratadas con EV a distintas edades y eutanasiadas a los 6 meses de vida

La apertura vaginal se adelantó en todos los grupos de ratas tratadas con estradiol, con excepción de las ratas tratadas a los 30 días de vida, ya que en estas ratas la apertura vaginal fue próxima a la administración del fármaco (Figura 1)

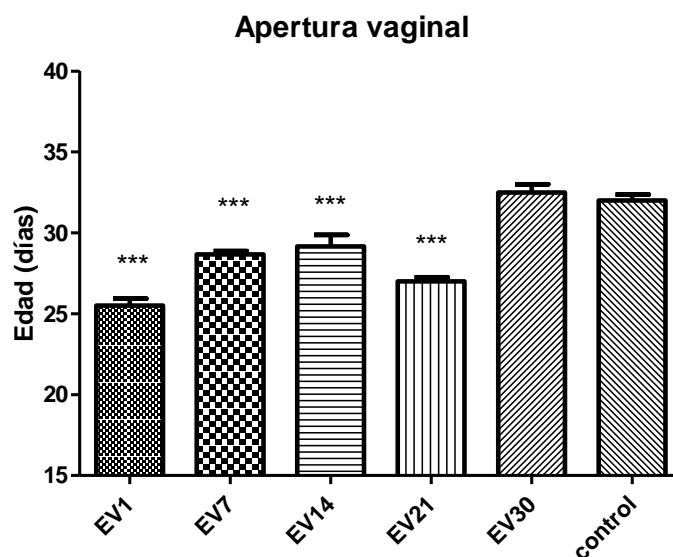


Figura 3: Apertura vaginal en ratas tratadas con EV a los 1, 7, 14, 21 y 30 días de edad (EV1, EV7, EV14, EV21, EV30). El grafico muestra la edad en que ocurre la apertura vaginal en ratas tratadas con EV a los 1, 7, 14, 21 y 30 días de edad (EV1, EV7, EV14, EV21, EV30) con respecto a ratas controles, *** $p < 0,01$ vs control. $n = 5$ en EV1, EV7, EV14, EV21, EV30 y $n = 6$ en controles.

Todas las ratas expuestas a estradiol desarrollaron aciclicidad estral después de la apertura vaginal, pero sólo las ratas tratadas a los 1, 7 y 14 días de vida permanecieron acíclicas durante los 180 días estudiados, en cambio las ratas tratadas a los 21 y 30 días de edad volvieron a tener ciclos estrales. En la figura 4 se muestran ciclos representativos de cada grupo de ratas tratadas con

EV y control. Se observa claramente que las ratas tratadas a los 1, 7 y 14 días de vida tienen ausencia de ciclos ya que se encuentran por largos periodos detenidas en una etapa del ciclo estral, a diferencia de las ratas tratadas a los 21 y 30 días, que se encuentran acíclicas al principio, pero en algún momento vuelven a ciclar.

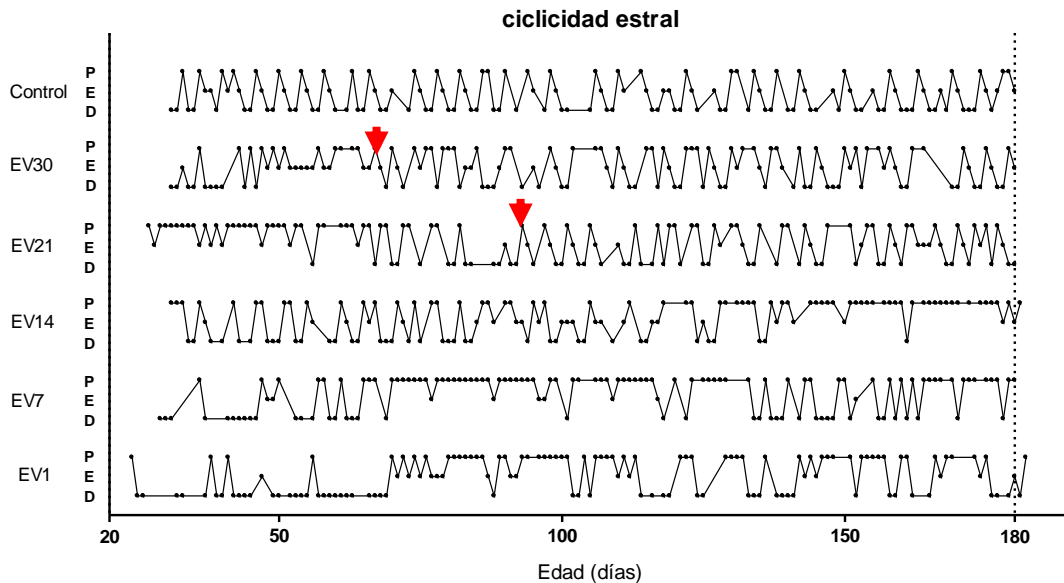


Figura 4: Ciclicidad estral en ratas tratadas con EV a distintas edades y sacrificadas a los 180 días de vida. En la figura se muestra la ciclicidad estral de las ratas tratadas con EV a día de edad (EV1), a los 7 (EV7), 14 (EV14), 21 (EV21), 30 días de edad (EV30) y controles. Cada etapa del ciclo estral se clasificó según las características del frotis vaginal en Proestro (P), Estro (E), o Diestro (D) de forma que un ciclo estral se considera como la secuencia P-E-D. En el eje de las abscisas se encuentra la edad de las ratas en días y en las ordenadas una rata representativa de cada grupo experimental. Las flechas indican el momento en que las ratas comienzan a ciclar después de haberse mantenido acíclicas.

En la cuantificación del número total de ciclos estrales en todo el periodo de seguimiento se observa que la cantidad de ciclos fue menor en las ratas tratadas con EV a los 21 y 30 días de edad comparados con el control, sin embargo, las ratas tratadas a los 21 y 30 días de edad tienen más ciclos en total que las ratas tratadas a los 1, 7 y 14 días, las que tuvieron prácticamente ausencia de ciclos. (Figura 5)

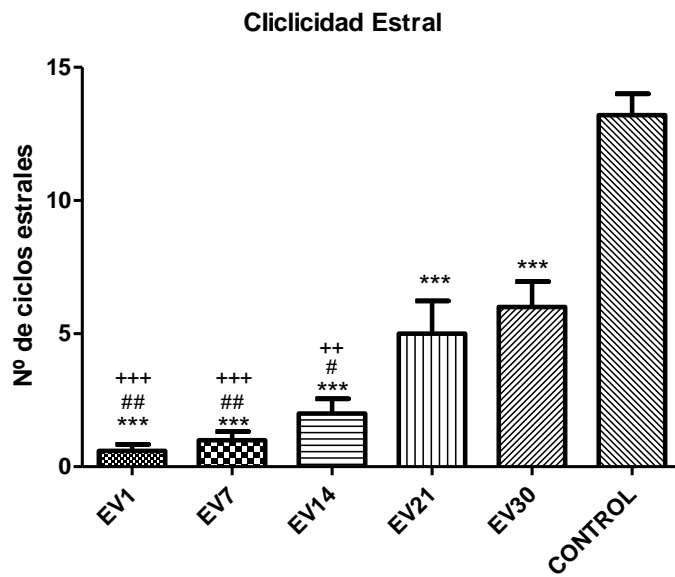


Figura 5: Cantidad de ciclos estrales desde la apertura vaginal hasta los 180 días de vida en ratas tratadas con EV a distintas edades. El gráfico representa la cantidad total de ciclos estrales de ratas tratadas con EV a los 1, 7, 14, 21 y 30 días de edad (EV1, EV7, EV14, EV21, EV30) y eutanasiadas a los 180 días de vida con respecto a ratas controles eutanasiadas a la misma edad. *** $p < 0,001$ vs control, # $p < 0,05$ vs EV21, ## $p < 0,01$ vs EV21, ++ $p < 0,01$ vs EV30, +++ $p < 0,001$ vs EV30.

1.2 Efectos producidos por la administración de EV a distintas edades sobre el desarrollo folicular a los 6 meses de vida

La ciclicidad estral, determinada mediante frotis vaginal, está en directa relación con la ciclicidad ovárica, entendiéndose esta ciclicidad como las variaciones cíclicas de la cantidad de folículos de distintas etapas de desarrollo y la producción de hormonas esteroidales.

A continuación se muestra el análisis detallado del desarrollo folicular en ratas que fueron inyectadas con EV los días 1, 7, 14, 21 y 30 de vida. Los folículos se contaron y midieron según los criterios descritos en la metodología.

La cantidad de folículos primordiales representa el pool de reserva folicular. En ratas de 180 días de vida que fueron inyectadas a distintas edades con EV no se encontró diferencias en la cantidad de folículos primordiales. (Figura 6) La determinación se realizó mediante el recuento de los folículos cada 3 cortes histológicos.

Después del ensamblaje folicular se forman los folículos primordiales y luego se recluta una gran cantidad de folículos que darán origen a los primeros

folículos primarios, los que presumiblemente serán los primeros en ovular alrededor de 25 días después. Posteriormente, en cada ciclo ovárico, se reclutan folículos que comenzarán a crecer y desarrollarse en las distintas etapas del desarrollo folicular.

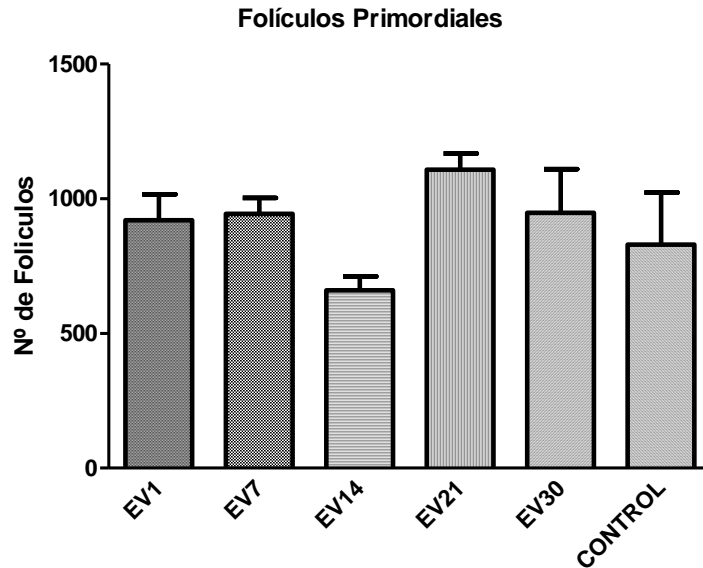


Figura 6: Cantidad de folículos primordiales en ratas tratadas con EV a distintas edades. El gráfico muestra número total de folículos primordiales (contados cada 3 cortes) en los grupos EV1, EV7, EV14, EV21, EV30 y CONTROL. Las barras representan el promedio ± EEM.

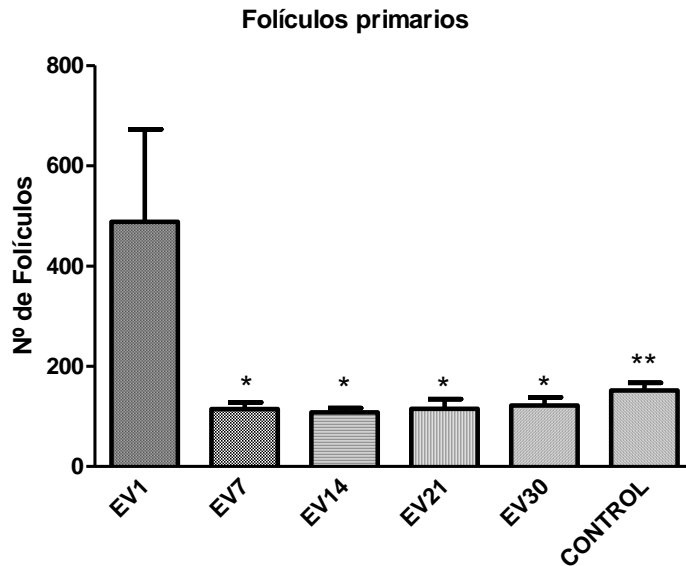


Figura 7: Cantidad de folículos primarios en ratas inyectadas con EV a distintas edades. El gráfico muestra número total de folículos primarios en los grupos EV1, EV7, EV14, EV21, EV30 y CONTROL. Las barras representan el promedio ± EEM. * $p < 0,05$ vs EV1, ** $p < 0,01$ vs EV1.

El primer estadio de desarrollo corresponde al folículo primario. Las ratas expuestas a EV al día 1 de vida tienen una gran cantidad de folículos primarios, en comparación con ratas tratadas a otras edades. (Figura 7). Luego de formarse el folículo primario, éste es reclutado por FSH y otros factores, los cuales al aumentar la cantidad de capas de células de granulosa forman los folículos secundarios. La cantidad de folículos secundarios en las ratas de 180 días de vida que fueron tratadas a distintas edades con EV no cambió significativamente con respecto al control (Figura 8).

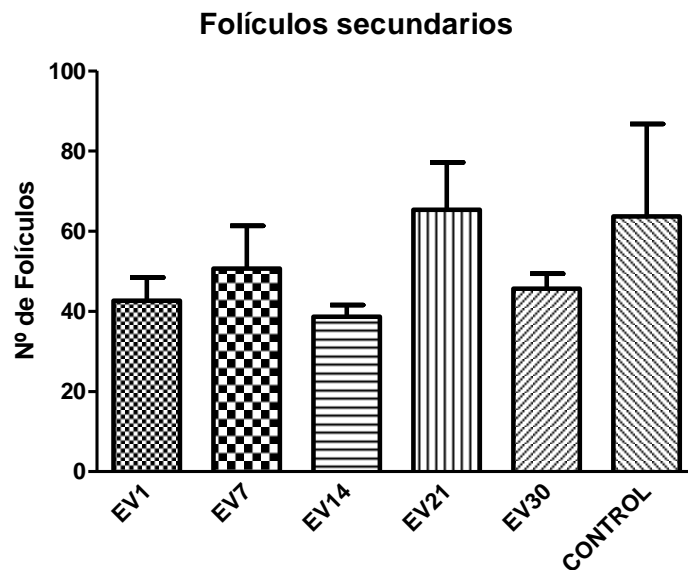


Figura 8: Cantidad de folículos secundarios en ratas inyectadas con EV a distintas edades. El gráfico muestra número total de folículos secundarios en los grupos EV1, EV7, EV14, EV21, EV30 y CONTROL. Las barras representan el promedio \pm EEM.

Sin embargo, si analizamos la tasa de progresión de folículos primarios a secundarios encontramos que existe una evidente disminución en las ratas tratadas con EV al día 1 de edad (Figura 9).

Al analizar la morfometría de los folículos antrales, se observa claramente un desarrollo folicular antral disminuido en ratas tratadas a edades más tempranas con EV (Figura 10). La cantidad de folículos antrales sanos es menor en las ratas tratadas los días 1 y 7 de vida comparada con la cantidad de folículos antrales en las ratas tratadas los días 14, 21 y 30 de edad, que tienen un desarrollo folicular similar al grupo control. A pesar de esto, la cantidad de

folículos antrales atrésicos es similar en todos los grupos experimentales (figura 10).

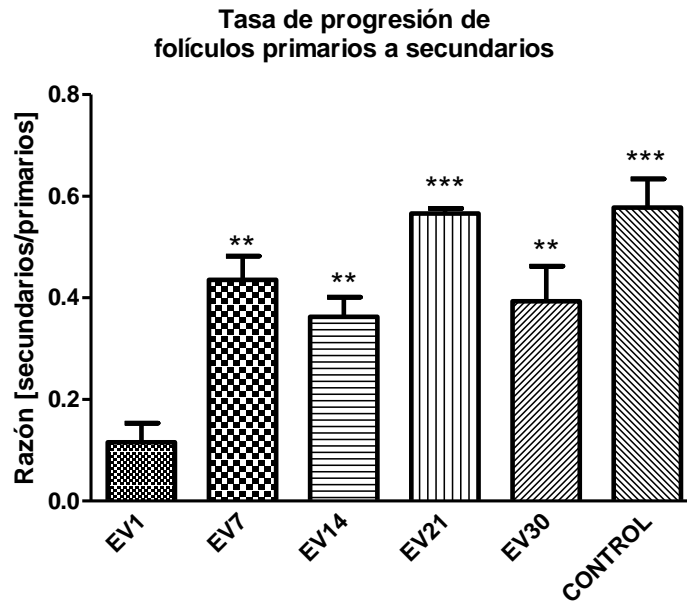


Figura 9: Tasa de progresión de folículos primarios a secundarios en ratas inyectadas con EV a distintas edades. El gráfico muestra el número total de folículos secundarios dividido por el número total de folículos primarios en los grupos EV1, EV7, EV14, EV21, EV30 y CONTROL. Las barras representan el promedio \pm EEM. ** $p < 0,01$ vs EV1, *** $p < 0,001$ vs EV1.

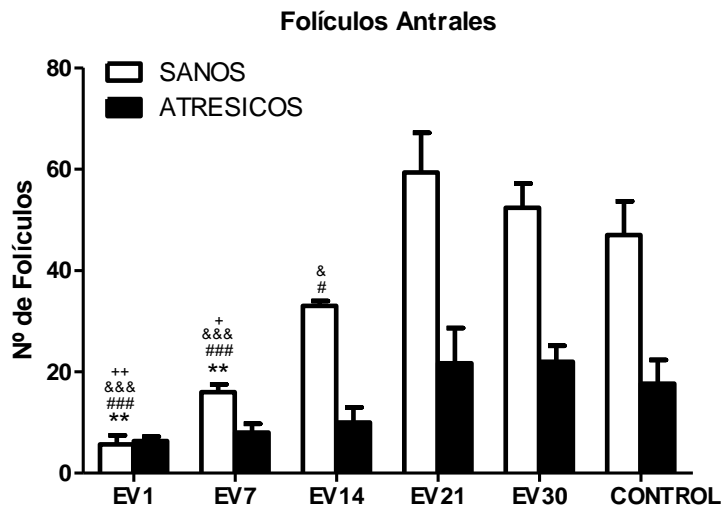


Figura 10: Cantidad de folículos antrales sanos y atrésicos. El gráfico muestra la cantidad de folículos antrales sanos (barras blancas) y folículos antrales atrésicos (barras negras) en ratas tratadas con EV los días 1, 7, 14, 21 y 30 de vida y sacrificadas al día 180 de vida comparada con ratas controles de la misma edad. Las barras representan el promedio \pm EEM. ** $p < 0,01$ vs CONTROL, ### $p < 0,001$ vs EV30, # $p < 0,05$ vs EV30, &&& $p < 0,001$ vs EV21, & $p < 0,05$ vs EV21, ++ $p < 0,01$ vs EV14, + $p < 0,05$ vs EV14

Si realizamos una distribución por tamaño de los folículos antrales sanos, observamos que las ratas tratadas con EV los días 1 y 7 de edad tienen un

desarrollo folicular disminuido con un patrón de distribución distinto del control. Sin embargo, las ratas tratadas a los días 14, 21 y 30 de edad con la hormona tienen un patrón de distribución de los folículos por tamaño que es similar al control. (Figura 11) Lo que consideramos como un patrón normal de distribución por tamaño de los folículos antrales es una gran cantidad de folículos en los tamaños más pequeños.

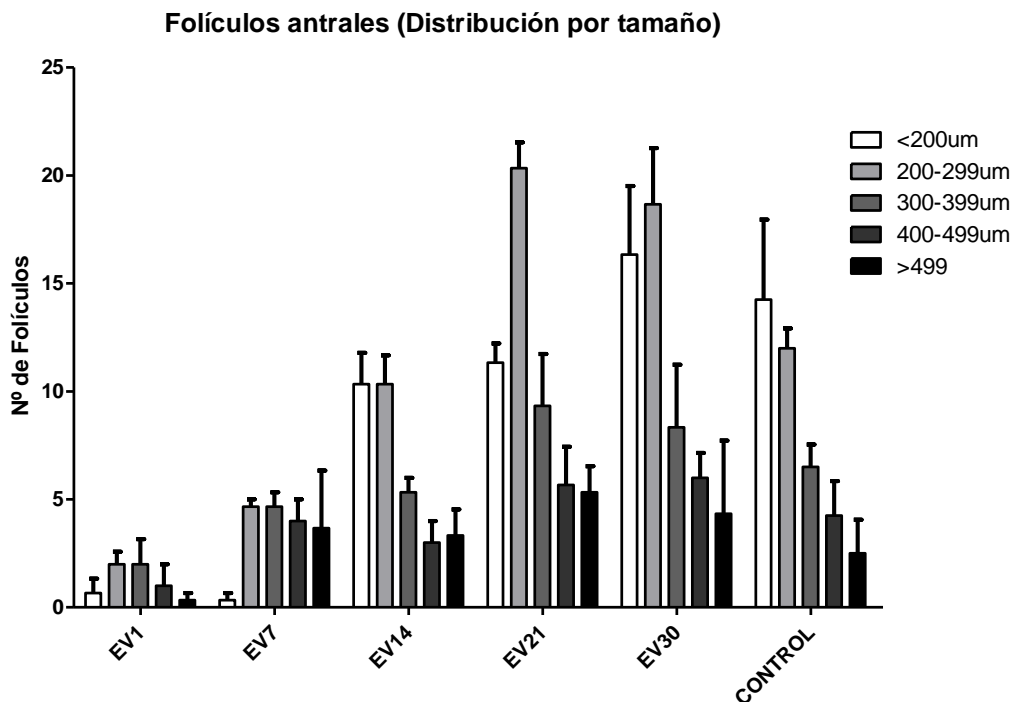


Figura 11: Distribución por tamaño de folículos antrales sanos. El presente gráfico muestra la cantidad total de folículos antrales distribuidos por tamaños en <200um, 200-299um, 300-399um, 400-499um y >499um, en los grupos EV1, EV7, EV14, EV21, EV30 y control. Las barras representan el promedio \pm EEM.

La cantidad de cuerpos lúteos es un índice de ovulación. En la figura 12 se muestra la cantidad total de cuerpos lúteos en los distintos grupos de ratas tratadas con EV. Se observa que las ratas tratadas con EV los días 1, 7 y 14 de vida no ovulan o tienen ovulaciones esporádicas, ya que prácticamente no tienen cuerpos lúteos en el ovario. Sin embargo, las ratas tratadas a edades más tardías con el fármaco (21 y 30 días de edad) recuperaron la capacidad de ovular ya que tienen la misma cantidad de cuerpos lúteos que los controles.

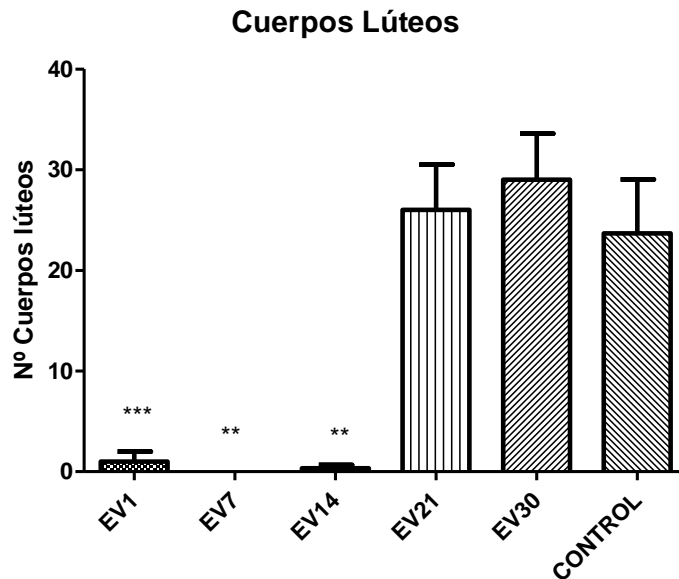


Figura 12: Cantidad de cuerpos lúteos en ratas tratadas con EV a distintas edades y eutanasiadas a los 180 días de vida. El gráfico representa la cantidad total de cuerpos lúteos en ratas tratadas con EV a los 1, 7, 14, 21 y 30 días de edad (EV1, EV7, EV14, EV21, EV30) y eutanasiadas a los 180 días de vida con respecto a ratas controles eutanasiadas a la misma edad. *** $p < 0,001$ vs control, ** $p < 0,01$ vs control.

Si los folículos no ovulan y tampoco van a atresia, se transforman en folículos anormales o estructuras quísticas. Dentro de estas estructuras existen 3 tipos de estructuras que siguen una secuencia lógica (Lara et al., 2000), comenzando con el Folículo tipo III que se genera a partir del folículo preovulatorio en ausencia de ovulación, luego el prequiste y por último el quiste. La figura 9 muestra la cantidad total de folículos quísticos, es decir, quistes y folículos potencialmente quísticos como folículos Tipo III y prequistes. Se observa que solo las ratas tratadas a los 7 y 14 días de edad con EV tienen una gran cantidad de estructuras quísticas comparadas con el control, y las ratas que han vuelto a ovular (EV21 y EV30) tienen una cantidad de estructuras quísticas similar al control.

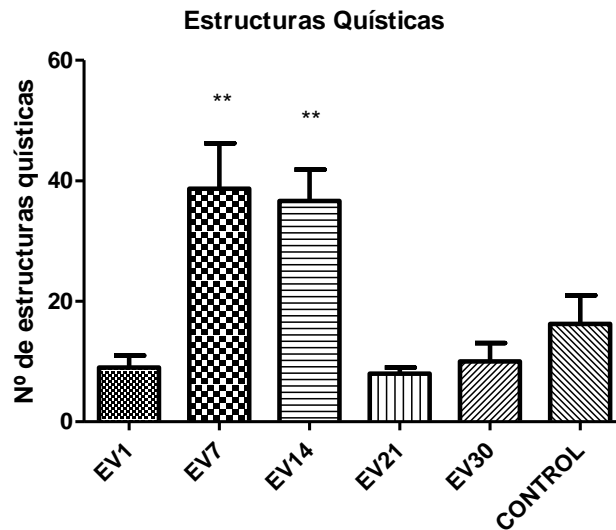


Figura 13: Cantidad estructuras quísticas en ratas tratadas con EV a distintas edades y eutanasiadas a los 180 días de vida. El gráfico representa la cantidad total de estructuras quísticas en ratas tratadas con EV a los 1, 7, 14, 21 y 30 días de edad (EV1, EV7, EV14, EV21, EV30) y eutanasiadas a los 180 días de vida con respecto a ratas controles eutanasiadas a la misma edad. ** $p < 0,01$ vs control.

1.2 Cambios en la concentración de noradrenalina ovárica en ratas tratadas con EV a distintas edades y eutanasiadas a los 180 días de vida

Con el objetivo de analizar el rol del sistema nervioso simpático en la mantención de PCO inducido por EV en el tiempo, se midió la concentración ovárica de noradrenalina. No hay diferencias significativas entre los promedios de concentración del analito en los grupos observados, sin embargo, existe diferencia entre la dispersión de los resultados entre los grupos de ratas que volvieron a ovular (EV30, EV21, controles) y los que no recuperaron la capacidad ovulatoria (EV1, EV7, EV14). (Figura 13)

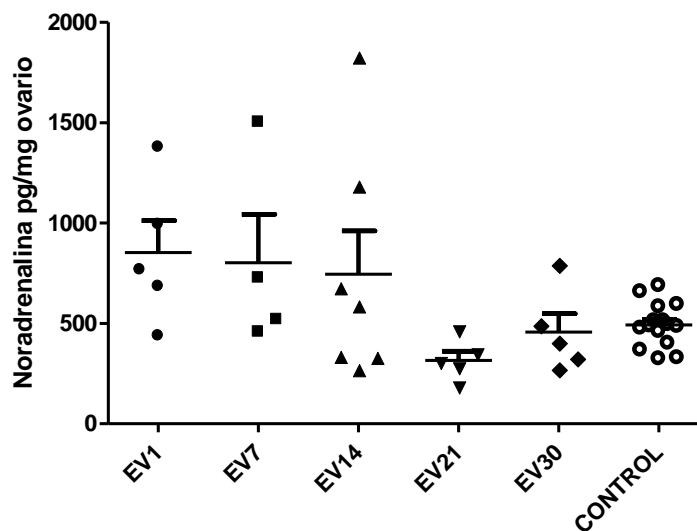


Figura 14: Concentración de NA en ratas tratadas con EV a distintas edades y eutanasiadas a los 180 días de vida. El gráfico representa la concentración de NA en ratas tratadas con EV a los 1, 7, 14, 21 y 30 días de edad (EV1, EV7, EV14, EV21, EV30) y eutanasiadas a los 180 días de vida con respecto a ratas controles eutanasiadas a la misma edad.

2) Efectos a corto plazo de la exposición neonatal a EV.

2.1 Cambios en la expresión génica ovárica en ratas tratadas a edad neonatal con EV

2.1.1 Cambios en la expresión de genes relacionados con neurotrofinas y sus receptores en ratas tratadas con EV al día 1 de vida y eutanasiadas 24 horas después determinados por la técnica de Microarray

En la Figura 15 se observan las membranas reveladas con el detector de quimioluminiscencia y en la tabla 3 se muestra un resumen con los genes que modificaron su expresión en mayor magnitud. Se observa que hay una expresión muy baja en general de todos los genes, pero que es suficiente para notar diferencias de expresión entre controles y tratados con EV. La intensidad de la quimioluminiscencia fue similar para los genes constitutivos en ambas membranas, lo que hace comparable el pool de ovarios de la condición control con el pool de ovarios de ratas tratadas con EV.

En la tabla 3 se muestran los genes que cambiaron su expresión en ovarios de ratas que fueron inyectadas con EV. La magnitud del cambio en la expresión

de los genes corresponde al valor de intensidad de quimioluminiscencia de ovarios de ratas controles dividido por el pool de ovarios de ratas tratadas con EV. Todos los genes que cambiaron su expresión fueron regulados a la baja.

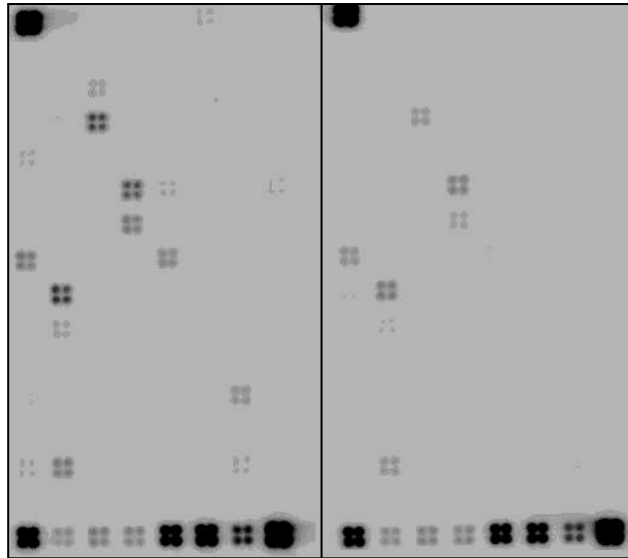


Figura 15: Membranas GEArray Neurotrofinas y Receptores. Se muestran 2 membranas de nitrocelulosa donde se encuentran sembrados los ARNm de 128 genes analizados. Cada cuadrado formado a su vez por 4 cuadrados pequeños, corresponde al ARNm correspondiente a un gen. La última fila, formada por 8 cuadrados corresponden a genes constitutivos y secuencias artificiales, como control del método. La membrana A corresponde al pool de ovarios control y la B al tratado con EV. (Imagen invertida)

Ngfrap1 corresponde a un gen que codifica para una proteína relacionada con la vía de transducción de señal del receptor NGFR. *Ncoa1-predicted* corresponde a una acetilasa de histonas. *Jun* y *Stat3* codifican para factores de transcripción asociados al desarrollo neuronal dependiente de neurotrofinas. Además, están río debajo de receptores de otros factores de crecimiento como EGFR. *Tgfa* es un factor de crecimiento que actúa vía el receptor EGFR. *Fus* es un potente factor de transcripción que actúa como cofactor de receptores nucleares, entre ellos el de estradiol.

Tabla 3: Modificación de la expresión génica inducida por estradiol en ovarios de ratas tratadas el día 1 de vida y eutanasiadas 24 horas después (Microarreglo). Se muestra los genes que cambiaron su expresión en más de 1,9 veces y cuya intensidad de quimioluminiscencia se podía apreciar a simple vista en ambas membranas. La magnitud del cambio de expresión es la división de la intensidad de quimioluminiscencia en ovarios de ratas controles dividido por la intensidad en ovarios de ratas tratadas con EV.

Gen	Control Gen de interés/18s (unidades relativas)	EV Gen de interés/18s (unidades relativas)
<i>Ngfrap1</i>	0.2291 ± 0.04809 N=4	2,0
<i>Tgfa</i>	0.08096 ± 0.02826 N=4	110,8
Jun	0.1904 ± 0.1072 N=4	2,9
Fus	0.4064 ± 0.1343 N=4	3,9
Ncoa-1	0.2881 ± 0.1643 N=4	6,4
Stat3	0.03838 ± 0.01169 N=4	12,2

Ya que las muestras corresponden a ovarios de ratas neonatas, los ARNm medidos pertenecen a células ováricas de ese momento de la vida de la rata, como células mesenquémicas, ovocitos, pregranulosa, células de granulosa de folículos primarios y secundarios y estroma.

2.1.2 Cambios en la expresión de genes relacionados con neurotrofinas y sus receptores en ratas tratadas con EV al día de vida y eutanasiadas 24 horas después determinados PCR en tiempo real

Una vez realizado el microarray los resultados se analizaron por PCR en tiempo real en una nueva serie experimental. La tabla 4 muestra los resultados de PCR en tiempo real para los genes que cambiaron 2 o más veces en el microarray.

Tabla 4: Modificación de la expresión génica inducida por estradiol en ovarios de ratas tratadas el día 1 de vida y eutanasiadas 24h después. (qPCR). Se muestra los resultados de qPCR para diversos genes que cambiaron su expresión en el microarreglo. NS = no significativo con respecto al control. N=1 corresponde a un pool de 6 ovarios

Gen	Control Gen de interés/18s (unidades relativas)	EV Gen de interés/18s (unidades relativas)	Significancia Estadística
<i>Ngfrap1</i>	0.2291 ± 0.04809 N=4	0.3184 ± 0.04235 N=4	NS(p= 0,1064)
<i>Tgfa</i>	0.08096 ± 0.02826 N=4	0.06495 ± 0.01117 N=4	NS(0,3087)
Jun	0.1904 ± 0.1072 N=4	0.09122 ± 0.02254 N=4	NS(p=0,1999)
Fus	0.4064 ± 0.1343 N=4	0.3197 ± 0.07513 N=4	NS(p=0,5938)
Ncoa-1	0.2881 ± 0.1643 N=4	0.1419 ± 0.07058 N=4	NS(p=0,2224)
Stat3	0.03838 ± 0.01169 N=4	0.08747 ± 0.01941 N=4	*p<0,05

2.1.3 Cambios en la expresión de genes relacionados con neurotrofinas y sus receptores en ratas tratadas con EV al día de vida y eutanasiadas 96 horas después determinados PCR en tiempo real

Para determinar si los cambios de expresión génica de los factores analizados anteriormente, se mantenían en el tiempo, incluso después del ensamblaje folicular, observamos la expresión de los mismos genes 96 horas después de la exposición a estradiol. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5: Modificación de la expresión génica inducida por estradiol en ovarios de ratas tratadas el día 1 de vida y eutanasiadas 96h después. (qPCR). Se muestra los resultados de qPCR para *tgfa*. Los resultados se expresan como promedio \pm EEM. N=1 corresponde a un pool de 6 ovarios. NS = no significativo con respecto al control.

Gen	Control Gen de interés/18s (unidades relativas)	EV Gen de interés/18s (unidades relativas)	Significancia Estadística
<i>Tgfa</i>	0.6501 \pm 0.3523 N=4	0.05377 \pm 0.009998 N=5	* $p < 0,05$
<i>Jun</i>	0.1904 \pm 0.1072 N=4	0.09122 \pm 0.02254 N=4	* $p < 0,05$
<i>Fus</i>	2.312 \pm 0.9187 N=4	0.7726 \pm 0.1047 N=5	NS($p=0,0505$)
<i>Ncoa-1</i>	1.362 \pm 0.4744 N=4	0.3310 \pm 0.06460 N=5	* $p < 0,05$
<i>Stat3</i>	0.4383 \pm 0.1545 N=4	0.1588 \pm 0.03983 N=5	* $p < 0,05$
<i>Ngfrap-1</i>	3.319 \pm 1.912 N=5	1.343 \pm 0.3677 N=5	NS($p=0,1699$)

2.2 Cambios en el desarrollo folicular y en el patrón de proliferación/apoptosis en ratas neonatas tratadas con estradiol el día 1 de vida y eutanasiadas 24 horas después

Los genes modificados tienen distintas funciones, de las cuales una de las más importantes es la participación de estos en la cascada de transducción de señales que lleva a apoptosis a través del receptor NGFR. Durante el ensamblaje folicular, que ocurre entre el día 1 y 4 de edad en la rata, ocurre apoptosis de una gran cantidad de ovocitos que se encuentran en nidos y simultáneamente disminuye la proliferación de células mesenquimáticas que rodean a los ovocitos, presumiblemente debido a una disminución de TrkA (Dissen et al., 1995).

Por esta razón realizamos el recuento de folículos primarios, como estimación del ensamblaje folicular, que está ocurriendo al mismo tiempo en que se modifican los genes a causa de la administración de EV. La Figura 16 muestra una fotografía representativa de un ovario control y de un ovario de una rata tratada con valerato de estradiol 24 horas antes, es decir, al día 1 de vida. Se observa un ovario control más grande en tamaño (fueron escogidos cortes

centrales), y además, morfológicamente se ven distintos. Se aprecia a simple vista una mayor cantidad de folículos primarios y primordiales en el ovario control comparado con el ovario tratado con EV. El recuento de folículos primarios se muestra en la figura 17. Se observa una disminución de folículos primarios en ratas tratadas con EV con respecto a las controles.

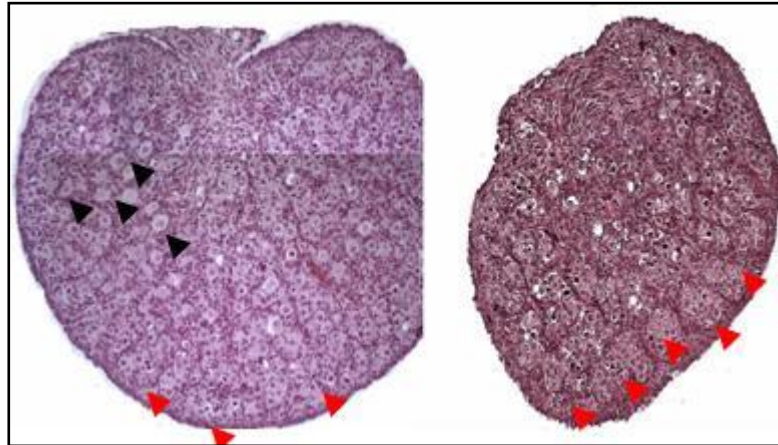


Figura 16: Imágenes representativas de ovario de rata control y tratada con EV al día 1 de edad y sacrificadas 24 horas después. Se muestran imágenes de un ovario control de rata de 2 días de edad (izquierda) y de ovario de rata tratada con EV al día 1 de edad y sacrificada al día 2 de edad (derecha). Las flechas negras indican folículos primarios y las rojas indican nidos de folículos no ensamblados. Aumento 40X.

En el ensamblaje folicular, junto con la apoptosis de ovocitos, es necesario el cese de la proliferación y comienzo de la diferenciación de las células mesenquimáticas y epiteliales que rodean a los ovocitos que se encuentran en nidos. Para medir proliferación celular, se observó el antígeno PCNA, indicador de proliferación, por inmunohistoquímica. Se observa una mayor proliferación celular en los ovarios de ratas que fueron tratadas con EV con respecto a controles. Figura 19. En la marca de apoptosis por TUNEL no se observan diferencias. Figura18

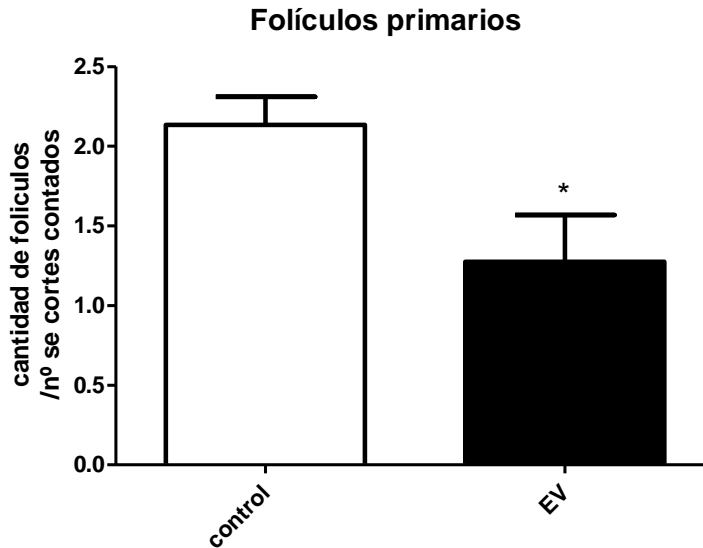


Figura 17: Cantidad de folículos primarios por número de cortes contados en ovario total de ratas tratadas con EV. La figura muestra la cantidad de folículos primarios, contados cada 5 cortes, dividido por el número de cortes contados en ovarios de ratas tratadas con EV al día de edad y eutanasiadas a los 2 días de vida con respecto a controles de la misma edad.* $p < 0,05$.

2.3 Acetilación de Histona H3 en ovarios de ratas neonatas tratadas con EV al día 1 de edad y sacrificadas 24 horas después

El gen Ncoa1 (Nuclear receptor coactivador 1), regulado a la baja según nuestro análisis de microarray, codifica para la proteína SRC-1, que es un miembro de las proteínas p160-steroid receptor coactivator (SRC), que tienen actividad tipo acetilasa de histonas y un dominio de localización nuclear. En la figura 20 se muestra la expresión de histona H3 acetilada en lisina 9, determinada por inmunohistoquímica, observándose lógicamente un patrón de expresión nuclear. Se observa además, que las células que presentan mayor marca de acetilación de histona H3 en lisina 9 corresponden a células que rodean a los nidos de ovocitos, sobretodo en el grupo de ratas tratadas con EV, donde se observa una marca más intensa.

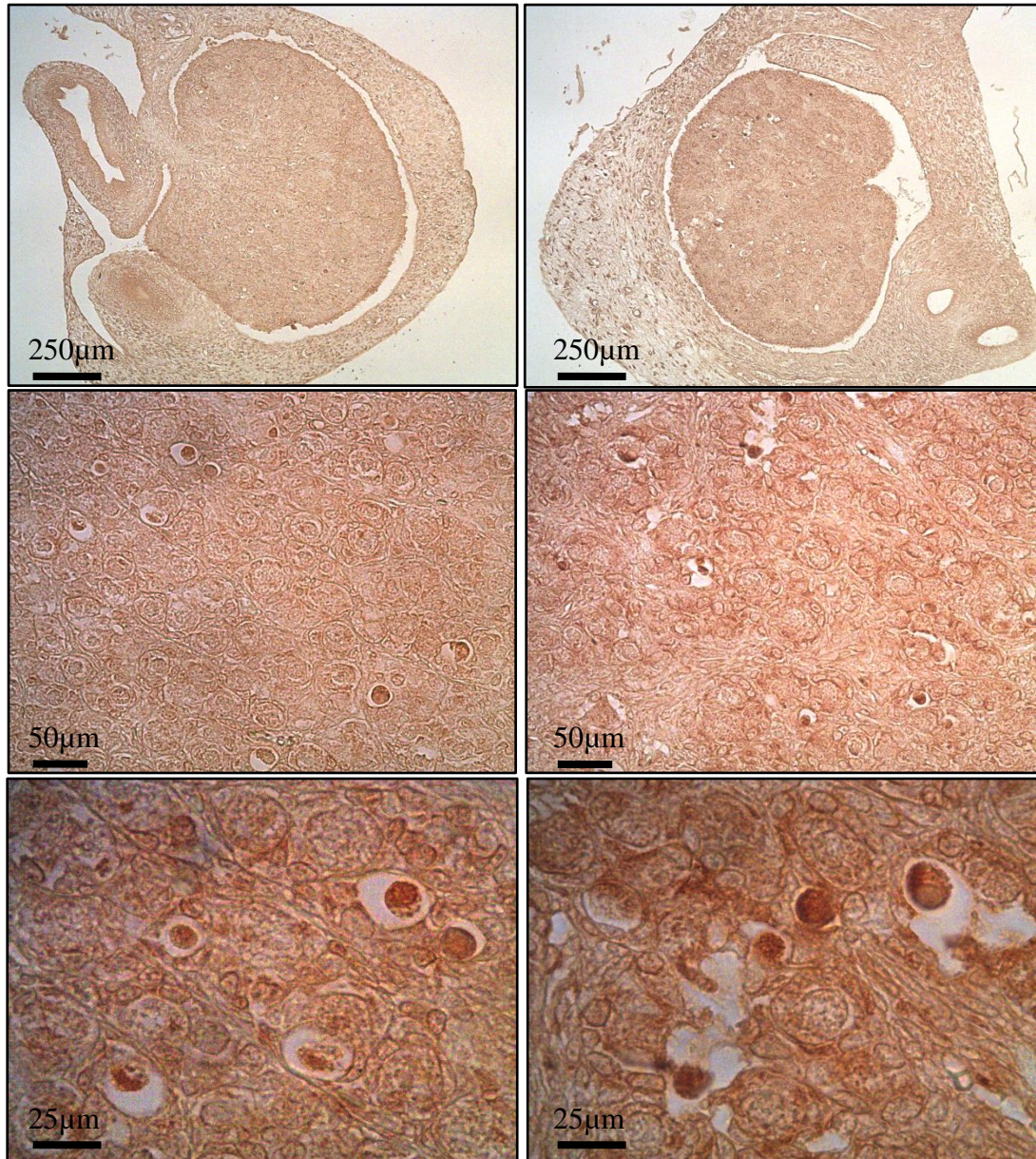


Figura 18: Detección de Apoptosis por TUNEL. La figura muestra microfotografías de cortes histológicos de ovarios en los cuales se realizó la técnica de TUNEL. A. Ovario de rata control, aumento 100X, B. Ovario de rata control, aumento 400X, C. Ovario de rata control, aumento 1000X, D. Ovario de rata tratada con EV, aumento, 100X, E. Ovario de rata tratada con EV, aumento 400X, F. Ovario de rata tratada con EV, aumento 1000X. Se muestran fotos representativas de un n=3-4 total por cada condición experimental.

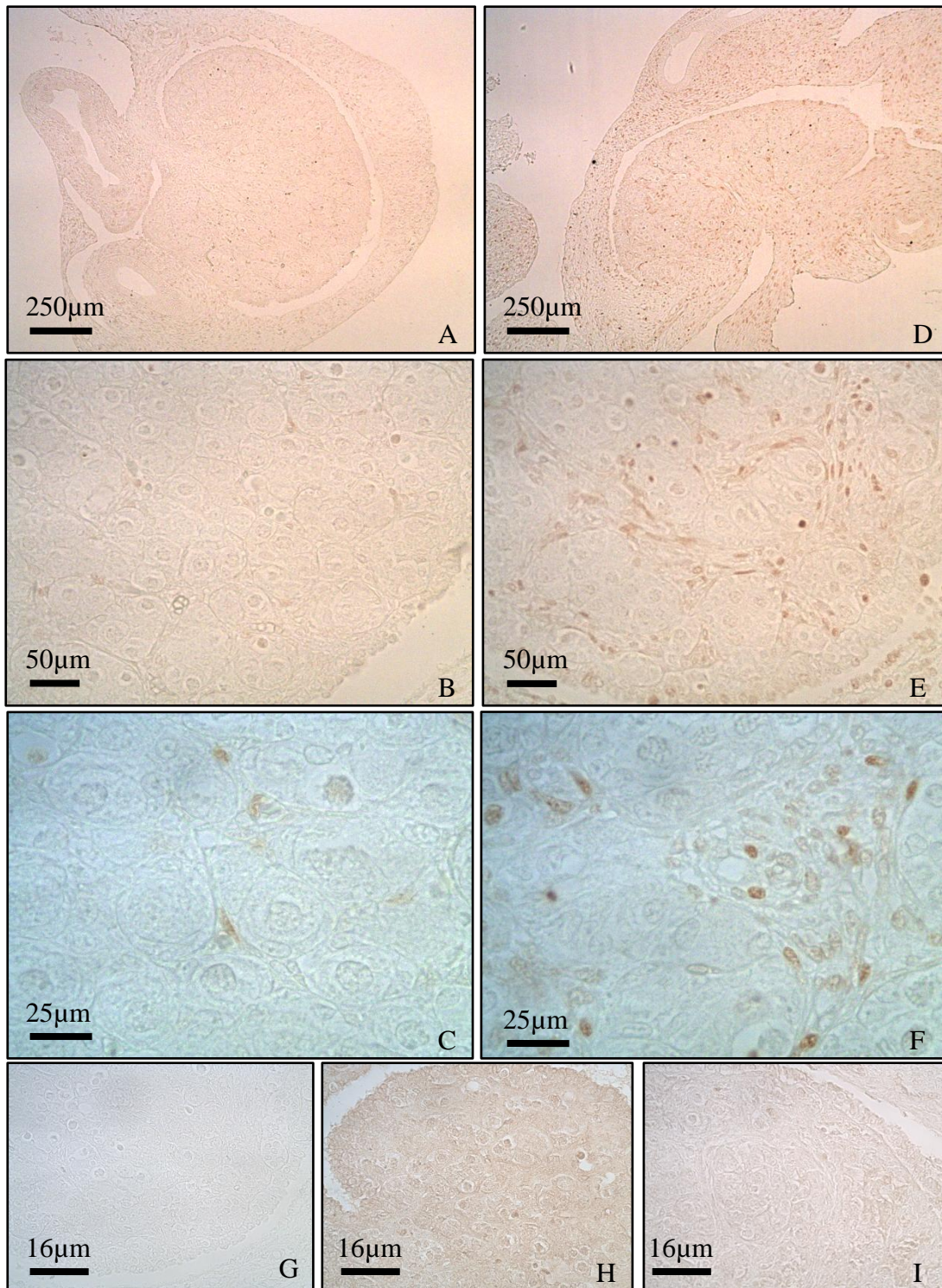


Figura 19: Detección de PCNA por inmunohistoquímica. La figura muestra microfotografías de cortes histológicos de ovarios sometidos a inmunohistoquímica contra el antígeno PCNA. A. Ovario de rata control, aumento 100X, B. Ovario de rata control, aumento 400X, C. Ovario de rata control, aumento 1000X, D. Ovario de rata tratada con EV, aumento, 100X, E. Ovario de rata tratada con EV, aumento 400X, F. Ovario de rata tratada con EV, aumento 1000X, G. Control Negativo (sin anticuerpo primario), H. Control Negativo (con suero de conejo), I. Control Negativo (con IgG de conejo). Se muestran fotos representativas de un n=3-4 total por cada condición experimental.

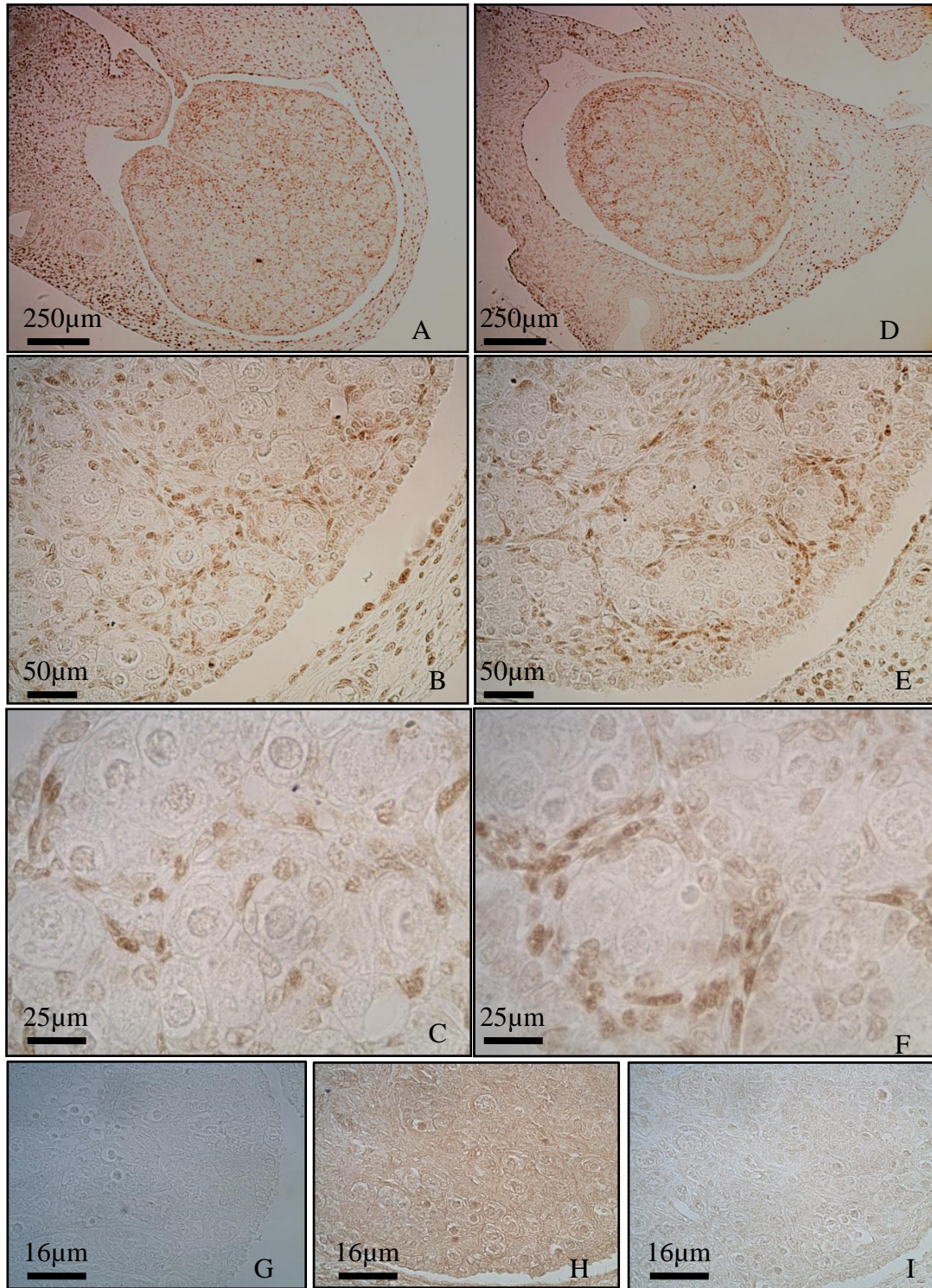


Figura 20: Detección de histona H3 acetilada en lisina 9. La figura muestra microfotografías de cortes histológicos de ovarios sometidos a inmunohistoquímica contra el antígeno Histona 3 acetilada en Lisina 9. A. Ovario de rata control, aumento 100X, B. Ovario de rata control, aumento 400X, C. Ovario de rata control, aumento 1000X, D. Ovario de rata tratada con EV, aumento, 100X, E. Ovario de rata tratada con EV, aumento 400X, F. Ovario de rata tratada con EV, aumento 1000X, G. Control Negativo (sin anticuerpo primario), H. Control Negativo (con suero de conejo), I. Control Negativo (con IgG de conejo). Se muestran fotos representativas de un n=3-4 total por cada condición experimental.

3) Efectos del bloqueo de NGF sobre la morfología ovárica y concentración de noradrenalina en ratas adultas tratadas con EV en la edad neonatal

Como se observa en la figura 21, la exposición a EV el día 1 de vida produce una disminución en la cantidad de folículos antrales aproximadamente a la mitad. Cuando se administra NGFAB los primeros días de vida, junto con la administración de EV, la cantidad de folículos antrales se mantiene similar a ratas tratadas con EV, sin embargo, existe una pequeña tendencia al aumento.

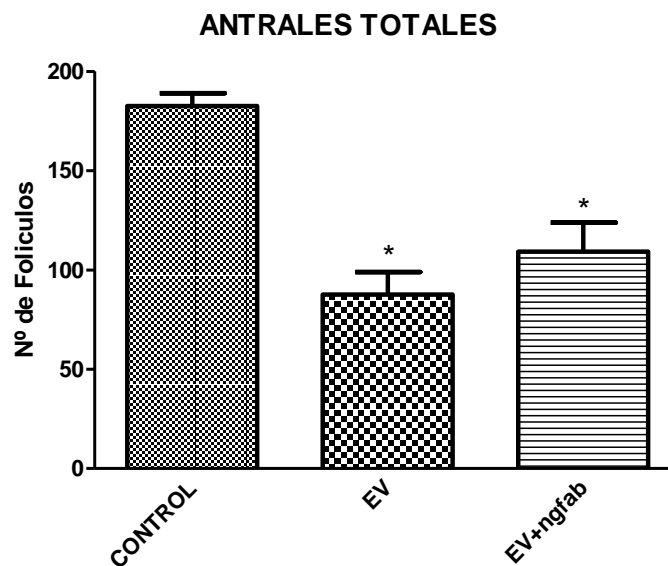


Figura 21: Cantidad de folículos antrales totales. El gráfico muestra la cantidad de folículos antrales en ratas tratadas con EV el día 1 de vida o con EV + NGFAB y sacrificadas al día 60 de vida comparada con ratas controles de la misma edad. Las barras representan el promedio \pm EEM. * $p < 0,05$ vs CONTROL

Los folículos antrales sanos se comportan de forma similar a los folículos antrales totales (Figura 22), ya que la cantidad de folículos atrésicos no cambia. De esta forma, con respecto al total de folículos antrales, existe un aumento del porcentaje de folículos atrésicos en ratas tratadas con EV, lo que no se recupera con la administración del anticuerpo NGFAB. (Figura 23)

Si realizamos una distribución de los folículos antrales sanos, según su tamaño, observamos que la administración de NGFAB logra aumentar la cantidad de folículos antrales de mayor tamaño. Para poder realizar un mejor seguimiento del desarrollo folicular, estos folículos se muestran en la figura 24 junto con los cuerpos lúteos, prequistes y quistes.

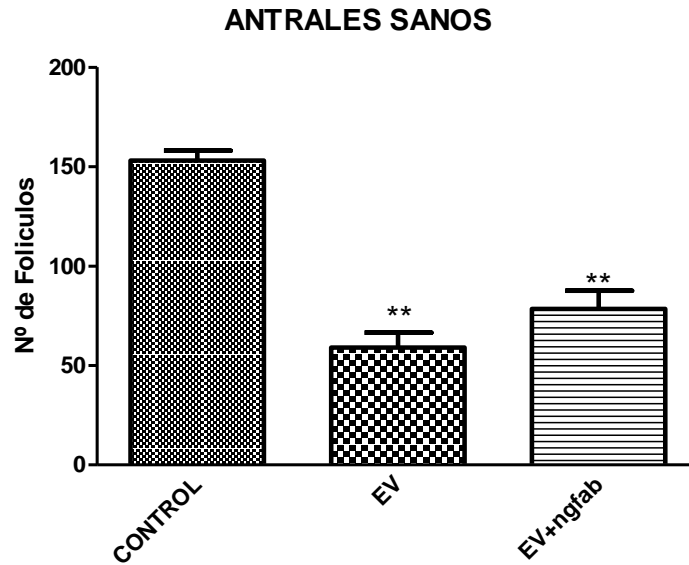


Figura 22: Cantidad de folículos antrales sanos. El gráfico muestra la cantidad de folículos antrales sanos en ratas tratadas con EV el día 1 de vida o con EV + NGFAB y sacrificadas al día 60 de vida comparada con ratas controles de la misma edad. Las barras representan el promedio \pm EEM. ** $p < 0,01$ vs CONTROL.

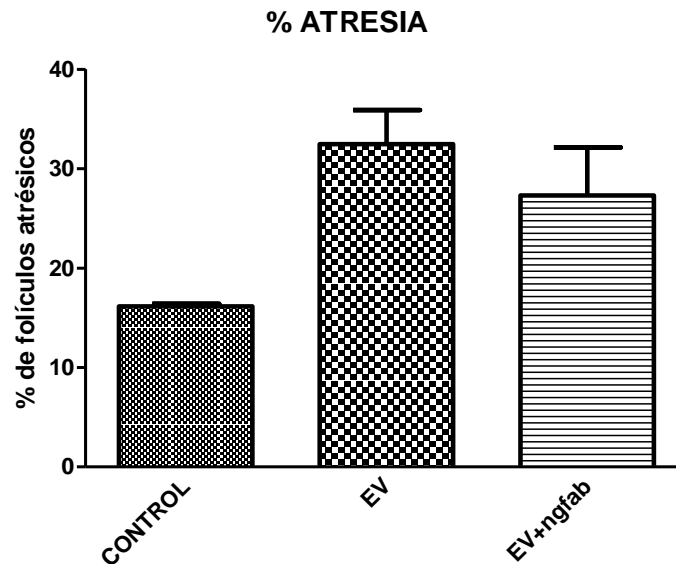


Figura 23: Porcentaje de atresia antral. El gráfico muestra el porcentaje de folículos antrales atrésicos en ratas tratadas con EV el día 1 de vida o con EV + NGFAB y sacrificadas al día 60 de vida comparada con ratas controles de la misma edad. Las barras representan el promedio \pm EEM.

Como se muestra en la figura 24 la administración de EV el día 1 de vida produce anovulación, por lo tanto se aprecia ausencia de cuerpos lúteos. La administración de NGFAB no restaura la ovulación ya que también se observa ausencia de cuerpos lúteos en este grupo.

La administración de EV produce un aumento de las estructuras prequísticas y quistes con respecto al control. Además, la administración del anticuerpo contra NGF y EV en forma simultánea incrementa la cantidad de folículos prequísticos y quistes en comparación con las ratas inyectadas sólo con EV. (Figura 24)

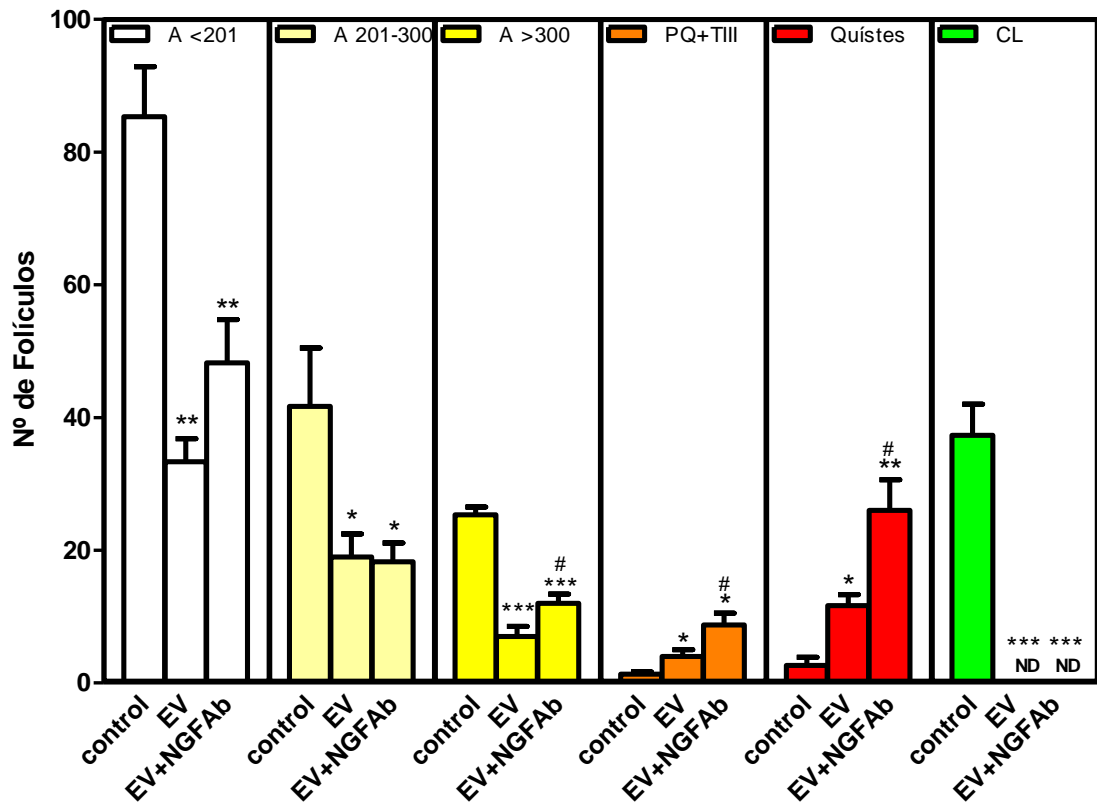


Figura 24: Desarrollo folicular antral y estructuras post-ovulatorias. El gráfico muestra los folículos antrales distribuidos según su tamaño (A < 201, A 201-300, A > 300 corresponden a folículos antrales menores a 201 μm , entre 201 y 300 μm y mayores a 300 μm respectivamente). Además se muestra los folículos prequísticos (PQ=prequiste, TIII= folículo tipo III), Quistes (Q) y cuerpos lúteos (CL) en ratas tratadas con EV el día 1 de vida o con EV + NGFAb y sacrificadas al día 60 de vida comparada con ratas controles de la misma edad. Las barras representan el promedio \pm EEM. * $p < 0,05$ vs control, ** $p < 0,01$ vs control, *** $p < 0,001$ vs control, # $p < 0,05$ vs EV. ND = no detectable.

Por otra parte, la concentración ovárica de noradrenalina aumenta en las ratas tratadas con EV en la edad neonatal con respecto a las ratas controles. Sin embargo, el anticuerpo contra NGFB, produce una denervación de las finbras nerviosas simpáticas disminuyendo considerablemente la concentración de NA

en ratas que fueron tratadas con EV (Figura 25).

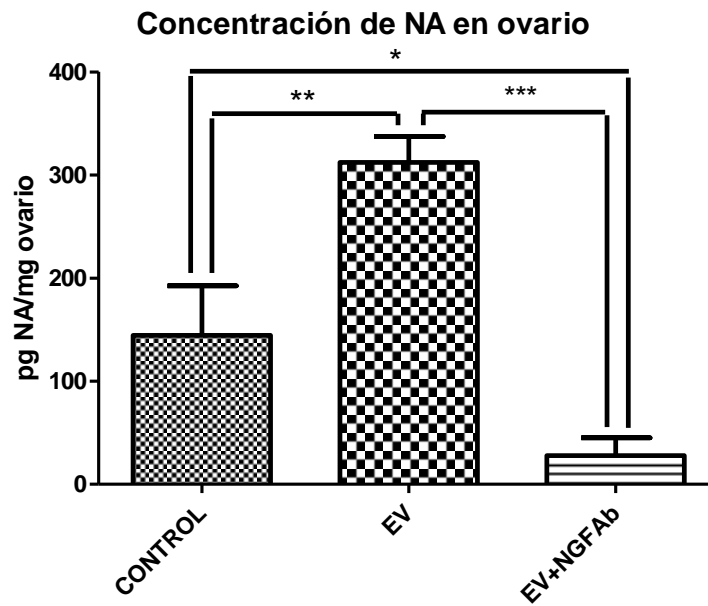


Figura 25: Concentración de NA en ratas tratadas con EV o EV + NGFAB en la edad neonatal eutanasiadas a los 60 días de vida comparada con controles. El gráfico representa la concentración de NA en ratas tratadas con EV a los 1, 7, 14, 21 y 30 días de edad (EV1, EV7, EV14, EV21, EV30) y eutanasiadas a los 180 días de vida con

DISCUSION

Durante los últimos años la investigación sobre la etiología del SOP se ha focalizado en el estudio de la exposición a niveles elevados de hormonas esteroidales en la vida fetal-neonatal y la programación de diversas alteraciones reproductivas y metabólicas en la vida adulta (Xita and Tsatsoulis, 2006; Dumesic et al., 2007; Sotomayor-Zarate et al., 2008; Nada et al., 2010). Debido a que la función ovárica en roedores neonatos es similar a la función ovárica del periodo gestacional en humanos y otras especies, utilizando la rata como modelo experimental, inyectamos EV en distintas edades durante la vida posnatal, para luego medir el comportamiento cíclico de los animales y analizar la función ovárica a largo plazo. Nuestro objetivo fue buscar la ventana de vulnerabilidad al efecto deletéreo producido por estradiol sobre la función ovárica. En el presente trabajo hemos encontrado que **existe una ventana de tiempo en que la administración de EV produce alteraciones irreversibles en el desarrollo folicular, ovulación y fisiología reproductiva de la rata, siendo este periodo de vulnerabilidad la edad neonatal-infantil.**

1) Efectos largo plazo de la exposición a EV en distintas edades sobre la fisiología reproductiva de la rata.

1.1 Cambios en la apertura vaginal y en la ciclicidad estral en ratas tratadas con EV a distintas edades y eutanasiadas a los 6 meses de vida.

El adelantamiento de la apertura vaginal observado en todos los grupos experimentales de ratas tratadas con EV concuerda con estudios anteriores publicados por nuestro grupo (Rosa et al., 2003; Sotomayor-Zarate et al., 2008). Esta característica se relaciona estrechamente con el desarrollo de pubertad precoz en la rata y mecánicamente se asocia a una sensibilización hipotalámica de los receptores de estrógenos por exposición temprana a estradiol, lo que produce que el hipotálamo produzca el pico de LH de la primera ovulación a edad más temprana y a concentraciones menores de

estradiol plasmático (Ojeda and Skinner, 2006; Rasier et al., 2007). Sin embargo, esto no significa que la apertura vaginal sea un parámetro funcional en las ratas tratadas con EV, ya que probablemente las ratas expuestas a EV no ovulen, como se ha demostrado anteriormente (Rosa et al., 2003; Ojeda and Skinner, 2006; Sotomayor-Zarate et al., 2008).

Las variaciones cíclicas de la concentración plasmática de las hormonas sexuales corresponden a un reflejo del funcionamiento cíclico tanto del desarrollo folicular ovárico como también de la ovulación. Así también, las hormonas sexuales producen variaciones cíclicas de las características morfológicas de las células observadas en los frotis vaginales, lo que nos permite tener una idea estimativa de la función ovárica durante todo el periodo estudiado (Marcondes et al., 2002; Freeman, 2006). En nuestro trabajo, encontramos que la exposición a EV en edades tempranas produce ausencia de ciclos estrales durante toda la vida reproductiva y por lo tanto es probable que los niveles plasmáticos de las hormonas sexuales también estén permanentemente alterados. Ya que estas hormonas son producidas mayoritariamente por los folículos ováricos, creemos que la exposición temprana a EV produce alteraciones permanentes en la función ovárica. Es muy interesante que las ratas que fueron tratadas con EV a edades más tardías, como 21 o 30 días de edad, comenzaran a presentar ciclos estrales después de un extenso periodo de tiempo en que permanecieron acíclicas. En consecuencia, la cantidad total de ciclos estrales fue mayor con respecto a las ratas tratadas a edades más tempranas, lo que sugiere que el daño producido por la administración de EV, en edades más tardías, no es permanente.

1.2 Efectos producidos por la administración de EV a distintas edades sobre el desarrollo folicular y la concentración de NA ovárica a los 6 meses de vida.

Al analizar la morfometría del ovario observamos 2 efectos distintos producidos por EV sobre la función ovárica, que al parecer son independientes. El primero, es una disminución en la cantidad de folículos en crecimiento o retraso en el

desarrollo folicular y el segundo una inhibición de la ovulación y en consecuencia la generación de estructuras anómalas o quistes foliculares.

Evidencias de la literatura muestran que la exposición a estradiol produce un estancamiento de los folículos en las etapas preantral y antral del desarrollo folicular (Schulster et al., 1984; Brawer et al., 1986; Lara et al., 2000; Rosa et al., 2003; Sotomayor-Zarate et al., 2008). En el presente trabajo mostramos que a un tiempo mucho más largo de lo que hasta ahora se ha estudiado (6 meses de edad), las ratas tratadas con EV los días 1 y 7 de vida, aún presentan un estancamiento del desarrollo folicular a esta edad. Con respecto a las ratas tratadas con EV el día 14 de edad, éstas presentan un desarrollo folicular normal, sin embargo, como se analizará más adelante, tienen la capacidad ovulatoria está disminuida. En contraste, encontramos que las ratas tratadas con EV a edades más tardías, como 21 y 30 días de edad, presentan un desarrollo folicular y ovulación similar a los controles cuando se realiza el análisis morfométrico de los folículos a los 6 meses de vida.

Si analizamos en detalle la morfometría de los folículos, se observa que las ratas que fueron tratadas con EV el día 1 de vida presentan una gran cantidad de folículos primarios, siendo la única edad en que la administración de EV produce una acumulación de folículos preantrales. Este aumento en los folículos primarios se debe a una detención del desarrollo folicular en esta etapa, ya que; 1) no hay cambios en el número de folículos primordiales, lo que nos hace presumir que el reclutamiento de folículos no se altera y 2) la progresión o transición desde el folículo primario al folículo secundario está disminuida. Debido a que el desarrollo folicular temprano carece de control por gonadotrofinas, y se ha postulado a las neurotrofinas y otros factores de crecimiento como los reguladores de la diferenciación y proliferación de células de granulosa (Dissen et al., 1995; Dissen et al., 1996; Ojeda et al., 2000; Romero et al., 2002; Dissen et al., 2004b; Ojeda and Skinner, 2006), pensamos que estos factores se encuentran alterados permanentemente cuando se

administra EV en el periodo neonatal. El largo tiempo transcurrido entre el momento de la inyección de EV y la edad en que se realizaron las determinaciones (6 meses de vida) dificulta una hipótesis mecanística de los efectos del disruptor endocrino a nivel molecular. Sin embargo, a nuestro parecer hay 2 opciones aparentemente más plausibles. La primera es que EV produzca una alteración en la expresión de algún factor que intervenga en el desarrollo folicular, y esta alteración se mantenga en el tiempo hasta los 6 meses de vida. La segunda opción corresponde a que la administración de EV podría producir un cambio en el patrón de expresión génica, por ejemplo a través de regulaciones epigenéticas, lo que repercutiría en el programa de expresión que tiene el folículo durante toda la etapa reproductiva. En esta última idea, el folículo por ejemplo sería incapaz de responder a algún factor de crecimiento por ausencia de expresión de su receptor o alguna proteína de señalización celular.

Es de gran importancia señalar que no hay alteraciones irreversibles en el desarrollo de los folículos preantrales cuando se administra EV después del ensamblaje folicular, es decir, en los grupos tratados a edades igual o superior a 7 días. Sin embargo, el desarrollo de folículos antrales está alterado de forma irreversible cuando se administra EV los días 1 y 7 de vida. El hecho de que haya una menor cantidad de folículos antrales en crecimiento puede tener las siguientes causas: 1) Una disminución del pool total de folículos y por lo tanto haya una menor cantidad de folículos preantrales, lo que repercute en la cantidad de folículos antrales que comienzan a crecer o 2) un estancamiento en el desarrollo folicular preantral. Claramente en el caso de ratas expuestas a EV el día 1 de vida existe un estancamiento del desarrollo folicular en la etapa de folículo primario. En el caso de ratas tratadas el día 7 de vida aparentemente existe un problema en la transición de folículo secundario a antral, por lo que creemos que puede existir una baja respuesta a gonadotrofinas o una insuficiencia hipotalámica. En cuanto a las ratas inyectadas con EV a la edad de 14, 21 y 30 días, se observa un desarrollo

folicular normal en la etapa antral. Este hallazgo demuestra que la severidad de la disrupción producida por EV depende de la etapa en que ocurrió la exposición.

La ausencia de cuerpos lúteos a los 6 meses de vida en las ratas que fueron tratadas con EV en los días 1, 7 y 14 de vida junto con la aciclicidad estral durante toda la vida en estos grupos experimentales indica que la exposición a EV en etapas tempranas del desarrollo posnatal produce anovulación en forma permanente en la rata. La idea de que existe una ventana de vulnerabilidad al tratamiento con estradiol se confirma si observamos el comportamiento de los grupos experimentales que recibieron el tratamiento a los 21 y 30 días de edad, que recuperaron la capacidad de ciclar y además tienen cuerpos lúteos en el ovario en cantidades similares a los controles a los 6 meses de vida, por lo tanto poseen ciclos ovulatorios después de mantenerse acíclicas.

El objetivo final de la foliculogénesis es la generación de un ovulo capaz de ser fecundado. En el caso de no haber ovulación, el ovocito muere y los folículos se transforman en quistes foliculares. Según lo propuesto por Lara y cols (Lara et al., 2000) el folículo preovulatorio, al no ovular, se transforma en una estructura anormal llamada folículo tipo III, luego pierde el ovocito transformándose en prequiste y posteriormente en quiste. El aumento de estructuras quísticas en ratas tratadas a los 7 y 14 días de edad se debe a que existe una falla ovulatoria, lo que se confirma por la ausencia de cuerpos lúteos y un desarrollo normal de los folículos antrales. En las ratas tratadas a los 14 días de edad existe un desarrollo folicular antral normal, sin embargo no hay ovulación y se forman quistes foliculares, lo que nos lleva a pensar que la ventana vulnerabilidad al daño producido por EV sobre la ovulación es distinta de la ventana de vulnerabilidad al daño producido por EV sobre desarrollo folicular. Además, probablemente los mecanismos de estos efectos sean distintos, siendo la anovulación un reflejo de un daño hipotalámico y el estancamiento del desarrollo folicular un efecto a nivel ovárico.

Las ratas tratadas en la edad neonatal (día 1 de vida) no ovulan, sin embargo, no presentan más quistes foliculares que los controles. Esto probablemente se debe a que hay una cantidad muy baja de folículos antrales en desarrollo que no alcanzan a ser preovulatorios, lo que impide tanto la formación de cuerpos lúteos como también de quistes foliculares.

La ausencia de ovulación y la generación de estructuras quísticas producidas en ratas tratadas en la edad neonatal e infantil con EV, condiciones que se mantienen durante un largo periodo de tiempo, se pueden explicar mediante el concepto de “programming”. A pesar de que tanto las células hipotalámicas como hipofisarias son capaces de producir GnRH y gonadotrofinas respectivamente en edades tempranas, este sistema de regulación madura solamente al llegar a la pubertad (Ojeda and Skinner, 2006). Cuando se interviene el desarrollo del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario con la administración de EV, se interfiere con el correcto desarrollo de los sistemas de feed-back positivo y negativo, produciendo cambios irreversibles en la sensibilidad de estos sistemas al efecto de estradiol endógeno (Veiga-Lopez et al., 2009). En consecuencia, se debieran observar niveles aberrantes de gonadotrofinas en la rata adulta y pérdida de la regulación a nivel central, que repercuten irreversiblemente en la foliculogénesis y ovulación.

Está bastante claro que el EV produce daños directos en el desarrollo folicular, como también en la regulación hormonal por gonadotrofinas y nerviosa por NA (Lara et al., 1993; Lara et al., 2000; Rosa et al., 2003; Sotomayor-Zarate et al., 2008). Sin embargo en este trabajo observamos que los daños producidos son reversibles si tanto el sistema reproductivo como el nervioso ovárico están completamente desarrollados y funcionales al momento de la administración de la hormona. Por lo tanto, se producen daños permanentes en el ovario que dependen de la interacción hormona-receptor en el momento de la administración pero que perduran en el tiempo hasta por lo menos los 6 meses de vida.

Probablemente sea interesante analizar a futuro si el mecanismo de estos efectos a largo plazo por EV depende de cambios epigenéticos permanentes en las células ováricas e hipotalámicas, que las pudieran reprogramar, lo que conduce a que los folículos no sean capaces de ovular o se estancan en cierta etapa del desarrollo folicular.

2) Efectos a corto plazo de la exposición neonatal a EV.

La exposición a hormonas en distintas etapas del desarrollo de los órganos y tejidos, produce alteraciones en distintas magnitudes y que pueden ser o no reversibles (Lara et al., 1993; Lara et al., 2000; Rosa et al., 2003; Rasier et al., 2007; Sotomayor-Zarate et al., 2008). Hemos demostrado (objetivo 1) que cuando se administra EV a ratas durante el primer día de vida, se producen daños irreversibles en el desarrollo folicular y ovulación en una magnitud mayor que cuando la hormona se administra en edades posteriores. Por lo tanto, es de especial interés estudiar los efectos a corto plazo en ratas expuestas a EV en la edad neonatal.

Estradiol actúa a través 2 tipos de receptores: receptores nucleares y receptores de membrana. A través de la activación de los receptores de la vía genómica clásica se modifica la expresión génica mediante la unión a elementos de respuesta a estradiol. Los receptores de membrana producen una cascada de transducción de señales que desencadena cambios rápidos citoplasmáticos. Es de nuestro interés estudiar particularmente los cambios en la expresión génica que pueden alterar el desarrollo del tejido ovárico y además perpetuar esta alteración en el tiempo. Los receptores de la vía genómica corresponden a ER-alfa y ER-beta. La expresión de estos receptores en el ovario neonatal depende de la especie. En la rata existe expresión del receptor alfa, visto por inmunohistoquímica, pero no del receptor beta de estradiol, antes del día 5 de vida. Nosotros realizamos PCR convencional para ER-alfa y ER-beta en los pool de ovarios de las ratas neonatas y los resultados coinciden con la literatura, mostrando expresión de ER-alfa, pero no ER-beta (Sar and

Welsch, 1999).

A través del receptor ER-alfa EV produce diversas modificaciones en genes que codifican para proteínas que según su función, podemos agrupar en: 1) proteínas asociadas al receptor de neurotrofinas NGFR, antes llamado p75^{NTR} (Ngfrap1, Jun)(Mukai et al., 2002; Reichardt, 2006; Bertrand et al., 2008), 2) proteínas asociadas con acetilación de histonas y modificación de la expresión génica por esteroides (Ncoa1)(Duplessis et al., 2009) y 3) Factores de crecimiento y factores de transcripción asociados a diferenciación, apoptosis y crecimiento celular (Tgfa, Fus, Jun) (Powers et al., 1998)

A continuación se analizará en detalle las posibles implicancias de las alteraciones de los niveles de ARNm de los genes cuyo resultado se comprobó por PCR en tiempo real.

Tgfa fue regulado a la baja 111 veces según la técnica de microarreglo. La gran magnitud del cambio de expresión puede ser un artefacto producido por la expresión muy baja del gen en ratas expuestas a EV (cercana al blanco), de hecho, cuando se analizan los resultados por PCR en tiempo real, no se observan cambios en la expresión de este gen. TGF α y EGF pertenecen a la misma familia de factores de transcripción, teniendo un 40% de similitud en la secuencia aminoacídica. EGF y TGF α se unen al mismo receptor con similares afinidades. TGF α se expresa en el ovocito desde el folículo primario en adelante, pero la intensidad de la inmunoreactividad disminuye mientras más avanzada es la etapa del folículo (Li et al., 1994). Adicionalmente, TGF α se expresa en las células de granulosa y cuerpo lúteo, donde se propone un rol en la diferenciación celular (Wang et al., 2002). El rol de TGF α en etapas tempranas del desarrollo folicular, como el ensamblaje folicular, no está claro. Sin embargo, se postula que TGF α participaría en la diferenciación de células de granulosa, que permite al folículo alcanzar etapas más avanzadas del desarrollo folicular. Según esto, realizamos qRT-PCR para *tgfa* a los 5 días de

vida (96h post administración de EV) y encontramos una disminución de la expresión de este gen, dando cabida a la hipótesis de que el deterioro del desarrollo folicular se debe en parte a la desregulación de los mecanismos de proliferación/diferenciación producidos por *tgfa* en las distintas células ováricas.

Ncoa-1 y *Stat3* son factores de transcripción que pueden modular la expresión de una gran cantidad de genes. En particular, *ncoa-1* (también llamado steroid receptor coactivator- 1, SRC1) participa como acetilasa histonas, y de esta forma regula la expresión génica por modificaciones postraduccionales de las histonas en respuesta a estradiol. Este gen y p300 son factores que pueden regular la actividad transcripcional de *stat3* entre otros genes (Giraud et al., 2002). Creemos que este mecanismo es crucial para entender los efectos a largo plazo producidos por EV, mostrados en el objetivo 1.

Stat3 es un factor de transcripción que actúa como mediador río abajo de la señalización vía NGF / TrkA (Ng et al., 2006). Además, *Stat3* forma parte de la vía de transducción de señal a través de TGF α /EGFR (Grandis et al., 1998). La regulación de la actividad proliferativa y diferenciación de las células que ocurre durante el ensamblaje folicular, es esencial para que dicho proceso se lleve a cabo de forma normal. La disminución en la expresión de *tgfa* y *stat3* pueden ser factores determinantes en el retraso del ensamblaje folicular observado en las ratas que fueron tratadas con EV. Además, ya que *tgfa* es uno de los factores que participa en la proliferación y diferenciación de las células de granulosa, puede ser un factor que contribuya al estancamiento en el desarrollo folicular visto en edades más tardías siempre y cuando la disminución en la expresión de *stat3* y *tgfa* sea durante la vida de la rata permanente.

c-jun es un factor de transcripción que pertenece a la vía JNK/MAPK (Keshet and Seger). La vía de las MAPK se encuentra río abajo de los receptores de factores de crecimiento como NGFB y TGF α entre otros. No se encuentra claro el rol de c-jun en el desarrollo folicular, pero puede participar como parte de la

señal vía factores de crecimiento antes nombrados.

Anteriormente, nuestro grupo (Sotomayor-Zarate et al., 2008) encontró que los niveles de ARNm de NGFB y NGFR aumentan considerablemente 36hrs después de la exposición a EV. Planteamos que este aumento de la señal NGF/TrkA a través de un aumento de la expresión de STAT3 a las 24 horas post administración de EV, produce un desbalance de las señales de diferenciación y proliferación en el ovario en desarrollo, conduciendo a una mayor proliferación de células mesenquimáticas y una mayor sobrevivencia de los ovocitos. (ANEXO1)

Dissen et al encontraron que los ARNm de NGF y TrkA disminuyen en los primeros días posnatal, planteando que esta disminución frenaría la proliferación y favorecería la diferenciación de las células mesenquimáticas o células epiteliales que formarán posteriormente los folículos, siendo este proceso esencial para el correcto ensamblaje folicular (Dissen et al., 1995). En nuestro modelo, al realizar inmunohistoquímica para PCNA podemos observar que existe una mayor marca para el antígeno en las células que rodean a los nidos de ovocitos en las ratas tratadas con EV y cuando analizamos la apoptosis por TUNEL no se observan cambios. Creemos que esta mayor proliferación de las células epiteliales y mesenquimáticas que rodean a los ovocitos correspondería al mecanismo del retraso en el ensamblaje folicular descrito anteriormente por otros autores. (ANEXO1) (Kezele and Skinner, 2003).

Creemos que gran parte de los daños reproductivos irreversibles causados por EV son producidos por reprogramación de las células ováricas en una etapa muy temprana del desarrollo folicular, y que además este “programmimg” de las células ováricas es producido por modificaciones epigenéticas de la expresión de genes. Mostramos que las células mesenquimáticas presentan una mayor marca para histona H3 acetilada en lisina 9 en ovarios de ratas tratadas con EV. La marca está localizada específicamente rodeando los nidos

de ovocitos en ratas tratadas con EV.

3) Efectos del bloqueo de NGF sobre el ovario en ratas adultas tratadas con EV en la edad neonatal.

Existe una vasta cantidad de evidencia que apoya el hecho de que tanto el sistema nervioso simpático como también la regulación paracrina mediante neurotrofinas están implicados en el desarrollo y mantención de la condición de ovario poliquístico inducido por estradiol en la rata (Lara et al., 1990; Barria et al., 1993; Lara et al., 1993; Rosa et al., 2003; Sotomayor-Zarate et al., 2008). En nuestro primer objetivo hemos demostrado que esta condición poliquística es irreversible en ratas expuestas a la hormona en edades tempranas de la vida. Además, ya que existe evidencia de un aumento de expresión de *ngfb* inmediatamente después de la exposición a la hormona (Sotomayor-Zarate et al., 2008), planteamos que la administración de un anticuerpo contra NGFB (NGFBAb) impide el daño producido sobre desarrollo folicular y la ovulación en ratas que fueron expuestas a EV.

NGFB es necesario para el desarrollo, mantención y sobrevivencia de las fibras nerviosas simpáticas ováricas. El bloqueo de NGFB produce atrofia de las fibras nerviosas simpáticas que llegan al ovario, donde se observa una drástica disminución de la concentración de NA, lo que observamos en nuestra serie experimental en ratas que fueron tratadas con EV y el anticuerpo policlonal contra NGFB. Además, en respuesta a esta disminución del tono adrenérgico sobre las células ováricas y la ausencia de transporte axonal retrógrado de NGFB (Schwab and Thoenen, 1977), se incrementa la producción y por lo tanto, la concentración de NGFB en el ovario adulto (ANEXO 2) (Tapia M, Lara HE, no publicado). Por lo tanto, en nuestras series experimentales que fueron inyectadas con el mismo anticuerpo usado anteriormente en el laboratorio, existe una concentración de NA muy baja y una concentración de NGFB alta.

En cuanto a la función ovárica la administración de NGFBAb a ratas control produce un retraso en el desarrollo folicular y alteraciones en la ovulación en ratas, con una magnitud mucho menor a la administración de estradiol (Lara et al., 1990; Lara et al., 2000). En nuestro protocolo de administración de NGFBAb intentamos bloquear la sobreexpresión de NGFB que se produce en forma temprana después de la exposición de ratas neonatas a EV, ya que pensamos que esta sobreexpresión de NGFB produce las fallas en el desarrollo folicular vistas en nuestros objetivos 1 y 2. Con respecto a este punto, concluimos que aunque el aumento inicial de NGFB, que ocurre en la edad neonatal, puede contribuir al desarrollo de PCO en la rata, sin embargo, no es el factor desencadenante de la patología, ya que el bloqueo de la neurotrofina no revierte la condición quística. Sin embargo, el aumento de NGF producido a consecuencia de la denervación, produce interesantes resultados que discutiremos a continuación.

EV disminuye a un 27% aproximadamente la cantidad folículos antrales de mayor tamaño en una rata de 60 días, cuando dicha hormona fue administrada a edad neonatal. La administración del anticuerpo contra NGFB produjo un aumento de este grupo de folículos recuperándose hasta 47%. Este interesante resultado nos muestra que el aumento de NGFB, producido por la denervación con NGFBAb, participa en la recuperación parcial de la cantidad de folículos antrales próximos a ovular en ratas inyectadas con EV.

A pesar de la recuperación parcial del desarrollo de folículos antrales de mayor tamaño, la administración del NGFBAb no recupera la capacidad ovulatoria en estas ratas, ya que se observa ausencia de cuerpos lúteos. Esto sugiere que el anticuerpo contra NGF no modificó la función hipotalámica que previamente había sido alterada por estradiol. Evidencias previas indican que el anticuerpo contra NGFB no atraviesa la barrera hemato-encefálica y por lo tanto su acción ocurre a nivel periférico.(Lara et al., 1990) La ausencia de ovulación genera necesariamente que los folículos antrales se transformen en estructuras

prequísticas como folículos tipo III y prequistes, los que efectivamente se encuentran aumentados. Además del aumento de estructuras prequísticas, se produjo lógicamente un aumento de los quistes foliculares. Aunque NGFB facilita el desarrollo folicular y la ovulación (Dissen et al., 1995; Dissen et al., 1996; Mayerhofer et al., 1996; Romero et al., 2002), un exceso de la neurotrofina en el ovario de rata causa desarrollo de prequistes y quistes foliculares en roedores y además es una característica de PCOS en humanos (Dissen et al., 2000; Dissen et al., 2009). Creemos que el soporte trófico aumentado de NGFB es responsable del aumento de estas estructuras anómalas en las ratas tratadas con EV (ANEXO 2). Una situación similar de aumento de estructuras quísticas se produce en animales adultos tratados con células sobreproductoras de NGFB y en animales transgénicos que sobreexpresan el péptido (Dissen et al., 2000; Dissen et al., 2009).

La denervación quirúrgica producida al cortar el nervio ovárico superior produce reversión de la condición de ovario poliquístico inducida por EV en ratas adultas, sin embargo, la disminución de NA producida en este modelo de administración neonatal de EV no logra revertir la condición poliquística. Lo descrito anteriormente, reafirma nuestros resultados en que se destaca al periodo neonatal de la vida de la rata como la etapa más sensible a producir daños irreversibles en la fisiología reproductiva del animal. En este periodo probablemente se producen una gran cantidad de cambios en la expresión génica que determinan que las células ováricas se reprogramen y den origen a estructuras foliculares anómalas. Los mecanismos de dicha alteración aun no se conocen, sin embargo nuestros resultados sugieren que la exposición a estradiol en etapas tempranas de la vida produce modificaciones epigenéticas de la expresión génica que se mantienen en el tiempo y hacen perdurar la patología.

4) Consideraciones del modelo experimental y proyecciones

La exposición a estradiol es mucho más dañina antes de la pubertad, y en concreto antes de los 21 días de vida. Hasta el día 16 de vida, mientras los sistemas neuroendocrino y reproductivo se encuentran aun en desarrollo, existen niveles elevados de alfa-fetoproteína (AFP), proteína plasmática ligante de estradiol (Ojeda and Skinner, 2006). Creemos que el papel de la AFP es proteger los sistemas neuroendocrino y reproductivo de la acción de compuestos con actividad estrogénica, mientras estos sistemas se encuentran en desarrollo. En nuestro modelo, los niveles plasmáticos de estradiol que son alcanzados después de la administración de EV son lo suficientemente altos como para sobrepasar la capacidad ligante de la AFP. Aunque los niveles de estradiol que se alcanza después de la administración EV son poco probables en un contexto fisiológico, es posible que los disruptores endocrinos que no tienen afinidad por la alfa-fetoproteína necesiten de una concentración más baja para producir el mismo efecto observado en nuestro modelo. Apoyando esta idea, las dosis bajas de estradiol no afectan el control hipotalámico de la función ovárica, pero RU2898, un agonista de los ERs, que no se une a la AFP, bloquea la producción de gonadotrofinas (Ojeda and Skinner, 2006). Por otra parte, el ratón knock out para AFP tiene un fenotipo similar al observado en las ratas tratadas con EV.

Una gran cantidad de estudios demuestran que la exposición prenatal a los esteroides puede ser uno de los factores causantes de PCO en humanos y modelos animales (Rosa et al., 2003; Xita and Tsatsoulis, 2006; Sotomayor-Zarate et al., 2008; Veiga-Lopez et al., 2009). Sin embargo, en el presente trabajo hemos demostrado que el período de vulnerabilidad del sistema neuroendocrino a los efectos nocivos de estradiol es mucho más extenso que el periodo prenatal o neonatal de la vida, debido a que tanto la función ovárica y su control hipotalámico maduran mucho después del nacimiento, en la etapa peripuberal. Este trabajo podría clarificar las ventanas temporales de vulnerabilidad y los mecanismos responsables de la etiología, aun desconocida, de la patología de PCO.

CONCLUSIONES

La ventana de tiempo en que la exposición a estradiol produce daños irreversibles en la función ovárica en la rata corresponde al periodo neonatal-infantil. En esta ventana de vulnerabilidad se producen alteraciones irreversibles en el desarrollo folicular y ovulación por mecanismos presumiblemente distintos, a nivel hipotalámico y ovárico.

La exposición a estradiol produce una gran cantidad de cambios tempranos en la expresión génica que afectan la regulación paracrina de la función ovárica. Es de especial interés clarificar el rol de factores de crecimiento como el TGF α y sus proteínas de transducción de señal, como Stat3 en la reprogramación de las células ováricas producida en la condición de ovario poliquístico inducido por EV. Además, es de importancia a futuro identificar si cambios epigenéticos de la expresión génica son los responsables de la irreversibilidad de la condición de ovario poliquístico.

La administración de NGFBAb recupera parcialmente el desarrollo de los folículos antrales, disminuido a causa de la exposición a EV. Sin embargo, no logra revertir la condición poliquística ovárica y tampoco la capacidad ovulatoria, incluso incrementando la cantidad de quistes foliculares, todo esto producto del aumento de NGFB producido en forma compensatoria por las células ováricas en las ratas denervadas.

REFERENCIAS

- Abir R, Fisch B, Jin S, Barnnet M, Ben-Haroush A, Felz C, Kessler-Icekson G, Feldberg D, Nitke S and Ao A (2005) Presence of NGF and its receptors in ovaries from human fetuses and adults. *Mol Hum Reprod* **11**:229-236.
- Balen A and Rajkowska M (2003) Polycystic ovary syndrome--a systemic disorder? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **17**:263-274.
- Barria A, Leyton V, Ojeda SR and Lara HE (1993) Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology* **133**:2696-2703.
- Bertrand MJ, Kenchappa RS, Andrieu D, Leclercq-Smekens M, Nguyen HN, Carter BD, Muscatelli F, Barker PA and De Backer O (2008) NRAGE, a p75NTR adaptor protein, is required for developmental apoptosis in vivo. *Cell Death Differ* **15**:1921-1929.
- Brawer JR, Munoz M and Farookhi R (1986) Development of the polycystic ovarian condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat. *Biol Reprod* **35**:647-655.
- Brawer JR, Naftolin F, Martin J and 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**:501-512.
- Broekmans FJ, Knauff EA, Valkenburg O, Laven JS, Eijkemans MJ and Fauser BC (2006) PCOS according to the Rotterdam consensus criteria: Change in prevalence among WHO-II anovulation and association with metabolic factors. *BJOG* **113**:1210-1217.
- Chomczynski P and Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**:156-159.
- Dissen GA, Garcia-Rudaz C, Paredes A, Mayer C, Mayerhofer A and Ojeda SR (2009) Excessive ovarian production of nerve growth factor facilitates development of cystic ovarian morphology in mice and is a feature of polycystic ovarian syndrome in humans. *Endocrinology* **150**:2906-2914.
- Dissen GA, Hirshfield AN, Malamed S and Ojeda SR (1995) Expression of neurotrophins and their receptors in the mammalian ovary is developmentally regulated: changes at the time of folliculogenesis. *Endocrinology* **136**:4681-4692.
- Dissen GA, Lara HE, Leyton V, Paredes A, Hill DF, Costa ME, Martinez-Serrano A and Ojeda SR (2000) Intraovarian excess of nerve growth factor increases androgen secretion and disrupts estrous cyclicity in the rat. *Endocrinology* **141**:1073-1082.
- Dissen GA, Mayerhofer A and Ojeda SR (1996) Participation of nerve growth factor in the regulation of ovarian function. *Zygote* **4**:309-312.
- Dissen GA, Paredes A, Romero C, Les Dees W and Ojeda SR (2004a) Neural and Neurotrophic Control of Ovarian Development, in *The Ovary* (Leung CK and Adashi Y eds) pp 3-23.

- Dissen GA, Paredes A, Romero C, Les Dees W and Ojeda SR (2004b) Neural and Neurotrophic control of ovarian development, in *The Ovary* (Leung CK and Adashi Y eds).
- Dorfman M, Arancibia S, Fiedler JL and Lara HE (2003) Chronic intermittent cold stress activates ovarian sympathetic nerves and modifies ovarian follicular development in the rat. *Biol Reprod* **68**:2038-2043.
- Dumesic DA, Abbott DH and Padmanabhan V (2007) Polycystic ovary syndrome and its developmental origins. *Rev Endocr Metab Disord* **8**:127-141.
- Duplessis TT, Koterba KL and Rowan BG (2009) Detection of ERalpha-SRC-1 interactions using bioluminescent resonance energy transfer. *Methods Mol Biol* **590**:253-263.
- Ferruz J, Barria A, Galleguillos X and Lara HE (1991) Release of norepinephrine from the rat ovary: local modulation of gonadotropins. *Biol Reprod* **45**:592-597.
- Forneris ML and Aguado LI (2002) Neonatal superior ovarian nerve transection disturbs the cyclic activity of the female rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* **82**:75-82.
- Freeman ME (2006) Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat, in *KNOBIL AND NEILL'S PHYSIOLOGY OF REPRODUCTION* (Neill JD ed) pp 2283-2326, Oxford, U.K.
- Giraud S, Bienvenu F, Avril S, Gascan H, Heery DM and Coqueret O (2002) Functional interaction of STAT3 transcription factor with the coactivator NcoA/SRC1a. *J Biol Chem* **277**:8004-8011.
- Grandis JR, Drenning SD, Chakraborty A, Zhou MY, Zeng Q, Pitt AS and Tweardy DJ (1998) Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor- mediated cell growth In vitro. *J Clin Invest* **102**:1385-1392.
- Greiner M, Paredes A, Araya V and Lara HE (2005) Role of stress and sympathetic innervation in the development of polycystic ovary syndrome. *Endocrine* **28**:319-324.
- Keshet Y and Seger R The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol* **661**:3-38.
- Kezele P and Skinner MK (2003) Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. *Endocrinology* **144**:3329-3337.
- Lara HE, Dees WL, Hiney JK, Dissen GA, Rivier C and Ojeda SR (1991) Functional recovery of the developing rat ovary after transplantation: contribution of the extrinsic innervation. *Endocrinology* **129**:1849-1860.
- Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL and Ojeda SR (2000) An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology* **141**:1059-1072.
- Lara HE, Dorfman M, Venegas M, Luza SM, Luna SL, Mayerhofer A, Guimaraes MA, Rosa ESAA and Ramirez VD (2002) Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary during a normal

- estrous cycle and in polycystic ovary syndrome: Studies on norepinephrine release. *Microsc Res Tech* **59**:495-502.
- Lara HE, Ferruz JL, Luza S, Bustamante DA, Borges Y and Ojeda SR (1993) Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* **133**:2690-2695.
- Lara HE, McDonald JK and Ojeda SR (1990) Involvement of nerve growth factor in female sexual development. *Endocrinology* **126**:364-375.
- Lawrence IE, Jr. and Burden HW (1980) The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *Anat Rec* **196**:51-59.
- Li S, Maruo T, Ladines-Llave CA, Samoto T, Kondo H and Mochizuki M (1994) Expression of transforming growth factor-alpha in the human ovary during follicular growth, regression and atresia. *Endocr J* **41**:693-701.
- Lucas A (1991) Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp* **156**:38-50; discussion 50-35.
- Malamed S, Gibney JA and Ojeda SR (1992) Ovarian innervation develops before initiation of folliculogenesis in the rat. *Cell Tissue Res* **270**:87-93.
- Marcondes FK, Bianchi FJ and Tanno AP (2002) Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* **62**:609-614.
- Mayerhofer A, Dissen GA, Costa ME and Ojeda SR (1997) A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* **138**:3320-3329.
- Mayerhofer A, Dissen GA, Parrott JA, Hill DF, Mayerhofer D, Garfield RE, Costa ME, Skinner MK and Ojeda SR (1996) Involvement of nerve growth factor in the ovulatory cascade: trkA receptor activation inhibits gap junctional communication between thecal cells. *Endocrinology* **137**:5662-5670.
- Mukai J, Shoji S, Kimura MT, Okubo S, Sano H, Suvanto P, Li Y, Irie S and Sato TA (2002) Structure-function analysis of NADE: identification of regions that mediate nerve growth factor-induced apoptosis. *J Biol Chem* **277**:13973-13982.
- Nada SE, Thompson RC and Padmanabhan V (2010) Developmental programming: differential effects of prenatal testosterone excess on insulin target tissues. *Endocrinology* **151**:5165-5173.
- Ng YP, Cheung ZH and Ip NY (2006) STAT3 as a downstream mediator of Trk signaling and functions. *J Biol Chem* **281**:15636-15644.
- Ojeda SR, Romero C, Tapia V and Dissen GA (2000) Neurotrophic and cell-cell dependent control of early follicular development. *Mol Cell Endocrinol* **163**:67-71.
- Ojeda SR and Skinner MK (2006) Puberty in the Rat, in *KNOBIL AND NEILL'S PHYSIOLOGY OF REPRODUCTION* (Neill JD ed) pp 2061-2126, Oxford, U.K.
- Paredes A, Galvez A, Leyton V, Aravena G, Fiedler JL, Bustamante D and Lara HE (1998) Stress promotes development of ovarian cysts in rats: the possible role of sympathetic nerve activation. *Endocrine* **8**:309-315.

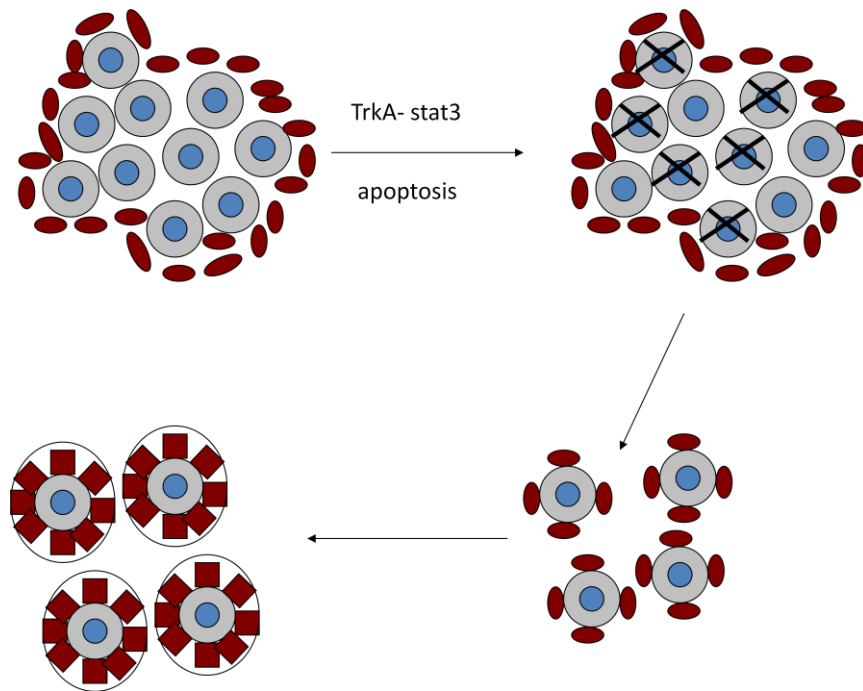
- Powers CA, Mathur M, Raaka BM, Ron D and Samuels HH (1998) TLS (translocated-in-liposarcoma) is a high-affinity interactor for steroid, thyroid hormone, and retinoid receptors. *Mol Endocrinol* **12**:4-18.
- Rajah R, Glaser EM and Hirshfield AN (1992) The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis. *Dev Dyn* **194**:177-192.
- Rasier G, Parent AS, Gerard A, Lebrethon MC and Bourguignon JP (2007) Early maturation of gonadotropin-releasing hormone secretion and sexual precocity after exposure of infant female rats to estradiol or dichlorodiphenyltrichloroethane. *Biol Reprod* **77**:734-742.
- Reichardt LF (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**:1545-1564.
- Ricu M, Paredes A, Greiner M, Ojeda SR and Lara HE (2008) Functional development of the ovarian noradrenergic innervation. *Endocrinology* **149**:50-56.
- Romero C, Paredes A, Dissen GA and Ojeda SR (2002) Nerve growth factor induces the expression of functional FSH receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* **143**:1485-1494.
- Rosa ESA, Guimaraes MA, Padmanabhan V and Lara HE (2003) Prepubertal administration of estradiol valerate disrupts cyclicity and leads to cystic ovarian morphology during adult life in the rat: role of sympathetic innervation. *Endocrinology* **144**:4289-4297.
- Sar M and Welsch F (1999) Differential expression of estrogen receptor-beta and estrogen receptor-alpha in the rat ovary. *Endocrinology* **140**:963-971.
- Schulster A, Farookhi R and Brawer JR (1984) Polycystic ovarian condition in estradiol valerate-treated rats: spontaneous changes in characteristic endocrine features. *Biol Reprod* **31**:587-593.
- Schwab ME and Thoenen H (1977) Retrograde axonal and transsynaptic transport of macromolecules: physiological and pathophysiological importance. *Agents Actions* **7**:361-368.
- Sotomayor-Zarate R, Dorfman M, Paredes A and Lara HE (2008) Neonatal exposure to estradiol valerate programs ovarian sympathetic innervation and follicular development in the adult rat. *Biol Reprod* **78**:673-680.
- Sotomayor R, Forray MI and Gysling K (2005) Acute morphine administration increases extracellular DA levels in the rat lateral septum by decreasing the GABAergic inhibitory tone in the ventral tegmental area. *J Neurosci Res* **81**:132-139.
- The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group (2004) Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* **81**:19-25.
- Toran-Allerand CD (1996) Mechanisms of estrogen action during neural development: mediation by interactions with the neurotrophins and their receptors? *J Steroid Biochem Mol Biol* **56**:169-178.
- Veiga-Lopez A, Astapova OI, Aizenberg EF, Lee JS and Padmanabhan V (2009) Developmental programming: contribution of prenatal androgen and estrogen to estradiol feedback systems and periovulatory hormonal dynamics in sheep. *Biol Reprod* **80**:718-725.

- Wang Y, Asselin E and Tsang BK (2002) Involvement of transforming growth factor alpha in the regulation of rat ovarian X-linked inhibitor of apoptosis protein expression and follicular growth by follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod* **66**:1672-1680.
- Xita N and Tsatsoulis A (2006) Review: fetal programming of polycystic ovary syndrome by androgen excess: evidence from experimental, clinical, and genetic association studies. *J Clin Endocrinol Metab* **91**:1660-1666.

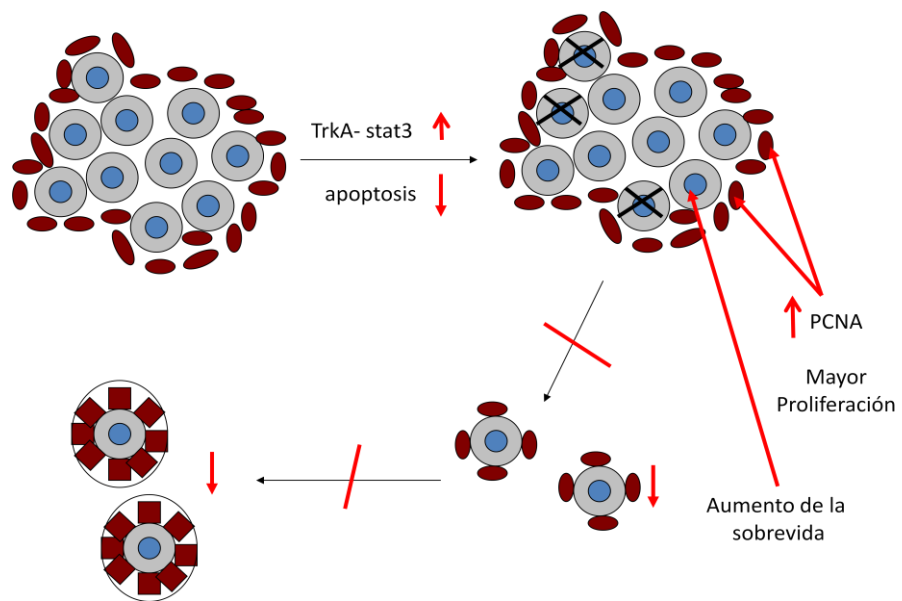
ANEXO 1

Modelo de retraso en el ensamblaje folicular propuesto.

En ausencia de EV.



En presencia de EV



ANEXO 2

Modelo de denervación con el anticuerpo policlonal contra NGFB

