



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
LABORATORIO DE NEUROBIOQUÍMICA**

**Aumento del tono adrenérgico intrínseco del ovario
al final del período reproductivo de la rata**

Memoria para optar al título de
BIOQUÍMICO

Fabián J. Jofré Romeo

PROFESOR PATROCINANTE

DR. ALFONSO H. PAREDES V.
Laboratorio de Neurobioquímica.
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas.
Universidad de Chile.

DIRECTORES DE MEMORIA

DRA. MONIKA M. GREINER G.
Escuela de Medicina.
Universidad Mayor.

DR. ALFONSO H. PAREDES V.
Laboratorio de Neurobioquímica.
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas.
Universidad de Chile.

**Santiago de Chile
2010**

A mi familia:

Sin lugar a duda, las penas y las alegrías de la vida se llevan mejor cuando se comparten, y en mi vida, he compartido cada cosa que me ha acelerado el corazón. Ustedes me enseñaron a luchar contra la adversidad, a creer en mí y a derrotar los prejuicios. No sé donde estemos en el futuro, lo que si se, es que seguiremos juntos

En estos seis años de estudios, caminando entre el ensayo y el error, he descubierto que el aprender es sólo un acto de fe, en cambio el crear es un acto de amor...

Mis Agradecimientos

Estas palabras están dedicadas a todas aquellas personas que no solo contribuyeron a la realización de esta memoria, sino que también ayudaron a mi formación personal y profesional.

Al Dr. Alfonso Paredes, que me acogió en su laboratorio cuando aún era un estudiante de pregrado, y me permitió progresar hasta transformar mi experiencia en esta memoria siendo mi director de tesis.

A la Dra. Monika Greiner quien acompañó y guió mi aprendizaje no sólo como profesora y tutora, sino también como amiga. Gracias por enseñarme el valor del orden y la meticulosidad.

Al Dr. Hernán Lara, quien sin ser mi tutor directo, me instó a la superación con comentarios que sólo alguien de su experiencia sabe dar.

A los Amigos que gané y conocí en esta hermosa experiencia:

Daniel, Gonzalo, Rafael y Jonathan, a los cuales nombré seguidos no porque no sean importantes sino porque si me pusiera a mencionar todos los gratos momentos que pasamos, tendría que dejar una tesis completa solo para agradecerles.

A mis compañeros de carrera:

Feña, me alegraba con su suspicacia, inteligencia y buenos consejos. Carito quien me apoyaba con mis dificultades trabajando con los animales. A los amigos que han sido un apoyo para mí siempre.

La Dani y la Pauli, mis mejores y más incondicionales amigas de la vida. El Jorge, mi compadre, Camilo, un gran colega, la Fran con Tomas, un ejemplo de pareja. La Carito que se transformó en mi salvavidas para los estudios. Y por último (y primero), mi familia que han sido el pilar fundamental en toda mi formación personal y profesional, por lo que les estaré agradecido el resto de mi vida.

Hacia el final de este trabajo conocí a Arantxa, quien me revisó y criticó sin cansancio mi tesis, ayudándome a tener éxito en el cometido de entregar un trabajo de excelencia.

Esta memoria ha sido financiada por el proyecto FONDECYT 1090159. Fue realizada bajo la dirección del Dr. Alfonso Paredes y la Dra Monika Greiner y llevada a cabo en el Laboratorio de Neurobioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Lista de abreviaturas.....	Página.3
1.1.a. Resumen.....	4
1.1. b. Abstract.....	5
1.2. Introducción.....	6
➤ Componente hormonal de la senescencia ovárica.....	7
➤ Componente nervioso extrínseco del ovario.....	8
➤ Componente nervioso intrínseco del ovario.....	10
➤ Formulación del Proyecto.....	11
1.3. Hipótesis.....	12
1.4. Objetivos.....	13
2. Materiales y Métodos.....	14
➤ 2.1. Animales.....	14
➤ 2.2. Utilización de tejidos.....	16
➤ 2.3. Inmunohistoquímica.....	20
➤ 2.4. Expresión de resultados.....	21
3.Resultados.....	22
➤ 3. a. Experimentos de incorporación y liberación.....	22
▪ Incorporación y liberación en ovario completo.....	22
▪ Incorporación y liberación en células ováricas.....	25
▪ Incorporación y liberación en tejido intersticial.....	28
➤ 3. b. Estudio de transportadores de catecolaminas.....	31
▪ Transportadores en ovario completo.....	31
▪ Transportadores en células ováricas.....	32
▪ Transportadores en ovario residual.....	34
➤ 3. c. Estudios Inmumohistoquímicos de marcadores nerviosos.....	36
4. Discusión.....	40
5. Conclusión.....	49
6. Proyecciones.....	51
7. Referencias.....	52
8. Anexo.....	55

Índice de Figuras

Figura 1: Sinapsis adrenérgica en células de la teca.....	Página 9
Figura 2: Esquema general de utilización de tejidos.....	15
Figura 3: Esquema de liberación en ovarios completos y residuales.....	18
Figura 4: Esquema de liberación en células.....	19
Figura 5: Incorporación de NE en ovarios completos.....	22
Figura 6: Liberación de NE en ovarios completos.....	24
Figura 7: Área bajo la curva de liberación de NE en ovarios completos.....	24
Figura 8: Incorporación de NE en células ováricas.....	26
Figura 9: Liberación de NE en células ováricas.....	27
Figura 10: Área bajo la curva de liberación de NE en células ováricas.....	27
Figura 11: Incorporación de NE en tejido intersticial.....	29
Figura 12: Liberación de NE en tejido intersticial.....	30
Figura 13: Área bajo la curva de liberación de NE en ovarios residuales.....	30
Figura 14: Incorporación de NE en ovarios completos con y sin cocaína.....	32
Figura 15: Incorporación de NE en células ováricas con y sin cocaína.....	33
Figura 16: Incorporación de NE en tejido intersticial con y sin cocaína.....	35
Figura 17: DAT y Snap-25 en ovarios de ratas de 6 meses.....	37
Figura 18: DAT y Snap-25 en ovarios de ratas de 10 meses.....	38
Figura 19: DAT y Snap-25 en ovarios de ratas de 14 meses.....	39

8 Índice de tablas

Tabla 1: Incorporación de NE en ovarios completos con y sin cocaína.....	Página 31
Tabla 2: Incorporación de NE en células ováricas con y sin cocaína.....	33
Tabla 3: Incorporación de NE en tejido intersticial con y sin cocaína.....	34

NE:.....Norepinefrina
³H-NE:.....Norepinefrina tritiada
LH:..... Hormona Luteinizante
FSH:.....Hormona Folículo Estimulante
BK:..... Buffer Krebs bicarbonato (Normal)
BKK+:.....Buffer Krebs potasio 80 mM
cpm:.....Cuentas por minuto
B:.....Basal
PE:.....Post estímulo
PCO: Ovario Poliquístico
PCA:.....Ácido perclórico
E:.....Estímulo
SONX:..... Rata con ovarios denervados
VIP:.....Péptido intestinal vasoactivo
CC.....Cocaína
NGF.....Factor de Crecimiento Nervioso
DAT..... Transportador de dopamina
NET.....Transportador de norepinefrina
CG.....Células de la granulosa
E.E:.....Error estándar

El componente nervioso simpático regula la función ovárica y su actividad nerviosa aumenta al final del periodo reproductivo, lo que supone una relación entre envejecimiento ovárico y aumento del tono simpático. Este componente nervioso tiene una porción extrínseca y otra intrínseca, las que podrían participar de manera complementaria en la regulación de la función ovárica normal y en especial en el proceso de envejecimiento del ovario.

Este trabajo tiene por objeto demostrar que células ováricas tipo-neuronas, que forman parte del componente nervioso intrínseco, participan en el aumento del tono adrenérgico, observado al final del periodo reproductivo. Para esto se midió la capacidad de incorporación y liberación de norepinefrina tritiada en ovarios completos, células ováricas obtenidas por punción y ovario residual posterior a la punción de ratas controles y ratas desnervadas de entre 6 a 12 meses de edad. Con el objeto de evaluar la participación de transportadores de catecolaminas se pre-incubó con una solución de cocaína 10 μ M. Para determinar la presencia de células tipo-neurona en el ovario, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica para los marcadores nerviosos DAT y Snap-25 en cortes de ovario pertenecientes a ratas de 6,10 y 14 meses de edad.

Los resultados muestran que en la senescencia existe un aumento sostenido del tono adrenérgico intrínseco del ovario, representando hasta un 30% del tono simpático total. Además, este componente intrínseco estaría conformado por células tipo-neuronas pertenecientes al tejido intersticial, las que poseen transportadores de catecolaminas que participarían en la homeostasis adrenérgica del ovario. Finalmente, los ensayos de inmunoreactividad para DAT y Snap-25 mostraron la presencia de estos marcadores en células de la granulosa y tejido intersticial, avalando la existencia de células tipo-neuronas en el ovario.

Lo anterior da luces sobre la participación de un componente celular distinto a los descritos anteriormente en el envejecimiento ovárico y permite plantear nuevas interpretaciones sobre los eventos que ocurren al final del periodo reproductivo tanto en ratas como en la mujer.

Increase of ovarian intrinsic adrenergic tone in aging rats

The nervous component that modulates ovarian function increases its activity at the end of reproductive period, implying a relationship between ovarian aging and an increase of the sympathetic tone. This nervous component has two portions, an extrinsic one and other intrinsic, which could participate in a complementary manner in the normal modulating ovarian function particularly in the ovary aging process.

This paper aims to demonstrate that ovarian neuron-like cells belonging to intrinsic nervous component are involved in the increase adrenergic tone observed at the end of reproductive period. For this, we measured the capability of releasing radiolabeled noradrenalin previously incorporated of full ovaries, ovarian cells obtained by puncture and remaining ovaries after puncture in controls and denervate rats between 6-12 months of age. In order to evaluate the participation of catecholamine carriers, the tissues were previously incubated with cocaine 10 μ M solution. To determine the presence of neuron-like cells in the ovary an immunohistochemical assay was performed for the nervous markers DAT and Snap-25 in ovary slides of 6, 10 and 14 months of age control rats.

The results show that during senescence there is an increase in the intrinsic adrenergic tone of the ovary, representing 30% of the total sympathetic tone. In addition, this component would consist of intrinsic cells neuron-like belonging to the interstitial tissue, which possesses catecholamine transporters, involved in adrenergic ovarian homeostasis.

Finally, immunoreactivity assays for DAT and Snap-25 showed the presence of these markers in granulosa cells and interstitial tissue, supporting the existence of neuron-like cells in the ovary.

This sheds light on the involvement of a different cellular compartment during ovarian aging and can suggest new interpretations of the events occurring at the end of the reproductive period in both rats and women.

1.2 Introducción

En la actualidad el desarrollo tecnológico y la igualdad de condiciones educacionales entre hombres como mujeres, ha favorecido el aumento de la presencia femenina en el campo laboral, produciendo como efecto colateral una postergación de la maternidad, siendo ésta desplazada más allá de los 30 años; lo anterior se refleja en una mayor probabilidad de sufrir distintas aberraciones durante el embarazo (aborto espontáneo, disfunción placentaria, entre otras) que pudiesen afectar tanto al feto como a la madre (1).

Fisiológicamente, el envejecimiento se relaciona con una disminución de la fertilidad de la mujer, la cual se encuentra supeditada a la cantidad de folículos primordiales encontrados en el ovario. En este sentido, se sabe que el período óptimo de fertilidad en la mujer es entre los 18 y los 31 años (2), edad a la cual la cantidad de folículos primordiales viables es la adecuada. Posterior a este período, tanto la fertilidad como el número de folículos primordiales comienza a decrecer, llegando a una etapa de subfertilidad cerca de los 37,5 años, donde el número de folículos primordiales ha disminuido hasta 25.000 desde los 1,5 millones existentes al momento de nacer. Cuando la reserva folicular disminuye hasta aproximadamente 1.000 folículos (alrededor de los 50,5 años de edad) el ovario es inactivo, no se puede establecer el mecanismo de retroalimentación del control hipotalámico y se establece la menopausia (3). Este período se caracteriza por una multiplicidad de desórdenes hormonales como hiper-androgenismo, hirsutismo, resistencia a la insulina, obesidad, tendencia a sufrir síndrome metabólico y problemas cardíacos entre otras patologías (4,5).

De igual manera, en el ovario de ratas y ratones, también se producen cambios durante el envejecimiento, los cuales morfológicamente se presentan en forma de estructuras quísticas, en una detención del desarrollo folicular y en un menor número de folículos antrales. Estos eventos no sólo se ha relacionado con el quiebre de la regulación hormonal del ovario, sino también a la contribución nerviosa simpática que existe en el mismo, y que se exacerbaría al final del período reproductivo tanto de la rata como de la mujer (6).

El hecho de que un estado peri-menopáusico o menopáusico afecte no sólo la fertilidad, sino también la calidad de vida femenina, hace urgente realizar estudios al respecto. Sin embargo, debido a contraposiciones éticas, económicas y temporales, el estudio de ésta condición se hace difícil en humanos, por lo cual, dada las semejanzas estructurales y neuroendocrinas existentes entre mujeres y ratas, los estudios y experimentos que se proponen en este trabajo, serán en ratas hembras de la cepa Sprague Dawley, de la cual es necesario conocer su fisiología y senescencia ovárica.

Componente hormonal de la senescencia ovárica

En primera instancia, a diferencia de los humanos, las ratas no poseen ciclos ovulatorios mensuales, sino períodos que duran de 4-5 días y que se denominan ciclos estrales, siendo “*estro (estrus)*” el día después que ocurre la ovulación. Sin embargo, y de manera consistente a lo que ocurre en ciclos reproductivos de mujeres peri-menopáusicas, la senescencia reproductiva en ratas se caracteriza por un quiebre en el control endocrino del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario, que se traduce en la variación de la duración de los ciclos estrales, en un incremento en la proporción de ciclos anovulatorios, en una reducción en el desarrollo de folículos ováricos, en un compromiso de la fertilidad y en un incremento en la proporción de ciclos con errática producción de estradiol y una elevada concentración de la hormona folículo estimulante (FSH) plasmática, junto con una disminución en la liberación de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y consecuente atenuación en los picos de hormona luteinizante (LH). Este hecho lleva a un período de *estro persistente* que se establece entre los 8-12 (a los 12 meses se establece la senescencia ovárica) meses de edad, para culminar en un período de anovulación que se establece entre los 17-21 meses de vida (7, 8, 9).

Junto con esto se ha observado que a medida que la rata envejece, el ovario presenta un mayor número de quistes y folículos tipo III, así como un menor número de cuerpos lúteos (6).

Componente Nervioso extrínseco del ovario

El ovario tanto de ratas como mujeres, posee regulación nerviosa simpática, es decir, se encuentra inervado extrínsecamente por fibras post-ganglionares adrenérgicas, cuyos axones son proyectados desde el ganglio celíaco. En ratas, el ovario recibe esta inervación simpática desde dos fuentes: (a) el plexo ovárico, el cual recorre la arteria ovárica regulando el flujo sanguíneo del ovario, pero sin penetrar en los cuerpos lúteos y células granulosas y (b) el nervio ovárico superior, el cual se encuentra asociado a ligamentos de sostén. En general, el nervio ovárico superior inerva preponderantemente componentes secretorios del ovario (como glándulas intersticiales y folículos) liberando norepinefrina (NE) y péptido intestinal vasoactivo (VIP). De esta manera participa en funciones fisiológicas específicas como la esteroidogénesis y el desarrollo folicular temprano (10, 11, 12).

Por otro lado, diferentes modelos experimentales han permitido demostrar que un aumento en la actividad simpática en el ovario, produce cambios morfológicos en este, siendo estos modelos el Valerato de Estradiol y estresores externos como el frío. Así, se demostró que el Valerato de Estradiol, aumenta la síntesis de NGF en el ovario, con el subsecuente aumento de la inervación simpática en éste, generando la aparición de quistes, un aumento en la incorporación de catecolaminas y una *downregulation* en los receptores β -adrenérgicos existentes en el ovario (13, 14,15).

Además se ha observado que el aumento de la actividad simpática en respuesta a estímulos como el frío, genera hipertrofia en células de la teca, además de favorecer el desarrollo temprano de quistes y folículos luteinizados (16). Estos resultados entregan un antecedente de lo que ocurre durante la senescencia ovárica, donde la actividad simpática en el ovario se ve aumentada en forma natural.

El hecho de que en el ovario exista actividad nerviosa adrenérgica, implica la existencia de terminales nerviosos, los cuales poseen la capacidad de incorporar catecolaminas (u homologos de éstas como la $^3\text{H-NE}$) por medio de transportadores específicos, como lo son el transportador de norepinefrina y dopamina (NET y DAT respectivamente). Además, en el terminal nervioso debe existir la maquinaria vesicular necesaria para la liberación de las catecolaminas, ya sean éstas de origen endógeno o exógeno, en respuesta al impulso

eléctrico nervioso (17). Este último puede ser experimentalmente reemplazado a través de estímulos electro-fisiológicos o químicos, como es el caso de la despolarización con potasio 80 mM. A continuación, en la figura 1, se muestra un esquema de cómo ocurre la sinapsis simpática de NE, en especial en las células de la teca.

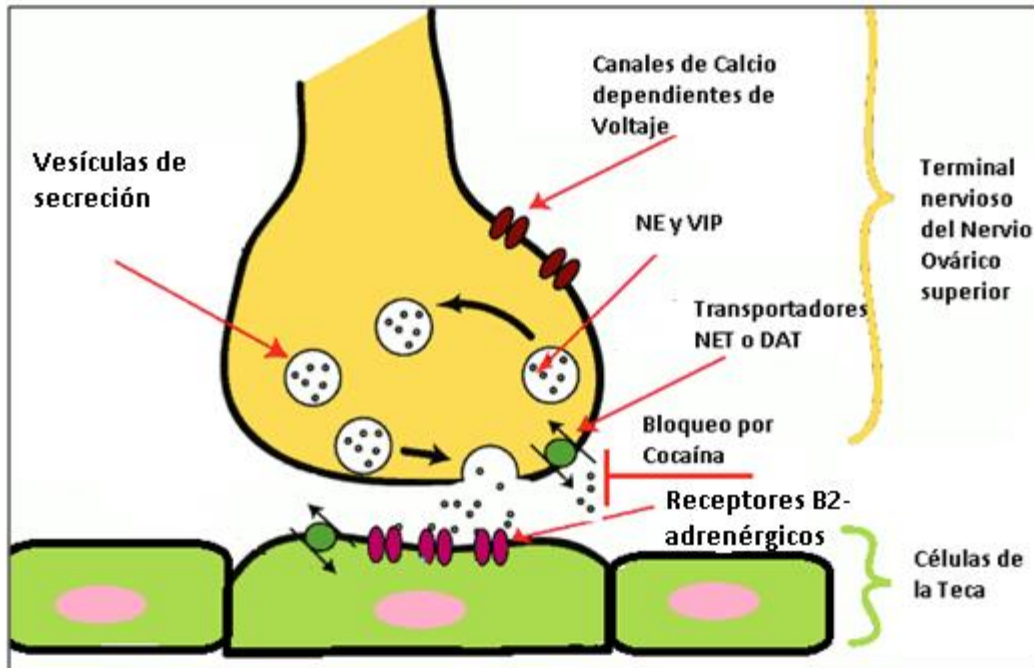


Figura 1, Sinapsis adrenérgica en células de la teca: El esquema muestra las principales características de un terminal nervioso, las cuales deben estar presentes en células con características tipo-neurona. Así, se observa que las células deben ser capaces de incorporar catecolaminas (NE) a través de transportadores específicos (NET y DAT), almacenarlas en vesículas y liberarlas en respuesta a un estímulo despolarizante.

Componente Nervioso intrínseco del ovario

Se ha demostrado que la inervación extrínseca representa el 90% de la NE presente en el ovario (22) y que al interrumpirla quirúrgicamente mediante el corte del nervio ovárico superior (ovarios denervados), se revierte el fenotipo quístico en ratas tratadas con Valerato de Estradiol, lo que entrega un antecedente sobre la importancia de este componente nervioso (18, 36). Sin embargo, a pesar de este corte de la inervación simpática extrínseca, queda un remanente de NE cercano a un 10-15% (11), sugiriendo la existencia de grupos celulares en el ovario que participan en la homeostasis de la NE. Con respecto a esto último, diversos estudios han logrado, por medio de tinciones con plata y el uso de marcadores citosólicos y de membrana, la identificación de neuronas ováricas catecolaminérgicas en distintas especies de mamíferos, entre ellas, primates, ratas y humanos (19). Así, en estudios inmuno-histoquímicos utilizando los marcadores neuronales NeuN y Tiroxina hidroxilasa (TH) se demostró que en ovarios de ratas *Wistar* existen efectivamente neuronas, las cuales se ubicarían preferentemente en la zona de la corteza y médula del ovario pero no en la zona interna, (concerniente a las células de la teca y granulosa) y que participarían de la homeostasis de NE y VIP en el ovario (20). Sin embargo, este estudio no logró demostrar la presencia de cuerpos neuronales en ovarios de la cepa emparentada Sprague-Dawley (utilizada en nuestros experimentos). No obstante, experimentos realizados en nuestro laboratorio, indican que ovarios tanto controles como denervados pertenecientes a esta cepa de ratas, son capaces de incorporar y posteriormente liberar $^3\text{H-NE}$ luego de un estímulo eléctrico o iónico (6, 21). Además, se ha demostrado que en el ovario de ratas se sintetiza el ARNm de TH, enzima marcapaso en la síntesis de catecolaminas, aunque no se ha logrado demostrar la presencia de la proteína (10). Así mismo, se determinó que en ratas pre-púberes, células de la granulosa son capaces de incorporar y liberar $^3\text{H-NE}$, donde la incorporación se realiza por medio de los transportadores de catecolaminas NET y DAT, y la liberación debido a un estímulo despolarizante, tal como respondería un tejido de origen nervioso (22). Finalmente, en estas células se ha encontrado la presencia de Snap-25, una proteína citosólica que participa en el acoplamiento y tráfico vesicular hacia el plasmalema, evento característico de neuronas durante la secreción de los neurotransmisores (23).

Formulación del Proyecto

Los antecedentes entregados han hecho referencia a que durante el envejecimiento se acrecienta tanto el tono simpático como el contenido NE en el ovario, sugiriendo que la actividad simpática participa directamente en los cambios morfológicos y funcionales del ovario en la senescencia reproductiva. Sin embargo, los estudios hechos al respecto han contemplado sólo contribución de la inervación extrínseca del ovario, dejando de lado el componente intrínseco, el cual durante la pre-pubertad se ha observado que es activo. En este sentido, la contribución intrínseca toma un nuevo giro, ya que los estudios funcionales realizados en esta cepa sólo contemplan células de la granulosa de ratas juveniles, y no en ratas al final del período reproductivo, las cuales tienen un menor número de folículos sanos y un mayor número de pre-quistes y quistes. Así, el presente estudio tiene por objeto extrapolar algunas de las estrategias experimentales utilizadas en ratas jóvenes y adultas, para determinar la existencia, participación y aumento de actividad adrenérgica intrínseca del ovario durante el envejecimiento, reconociendo además la localización de los grupos celulares implicados. Estos grupos celulares no necesariamente deben ser de origen folicular, abriendo la posibilidad de encontrar actividad tipo nerviosa en el tejido intersticial. Además, se abordará la relación que hay entre ambos tipos de componentes nerviosos existentes en el ovario, haciendo énfasis en la importancia fisiológica de éstos al final del período reproductivo de la rata.

Finalmente, los resultados que se obtengan del presente trabajo, serán valiosos para la interpretación no sólo en la fisiología del animal de estudio, sino también en el entendimiento de los procesos de envejecimiento ovárico en la mujer, abriendo la puerta hacia futuras terapias relacionadas con el aplazamiento del período de sub-fertilidad.

“Al final del periodo reproductivo de ratas Sprague-Dawley, células intrínsecas del ovario que poseen características tipo-neurona, favorecen el aumento del tono adrenérgico total del ovario”

General:

Demostrar que al final del período reproductivo, células intrínsecas del ovario son capaces de incorporar y liberar $^3\text{H-NE}$, favoreciendo el aumento del tono adrenérgico total del ovario.

Específicos:

1.- Evaluar la participación del componente nervioso extrínseco e intrínseco del ovario al final del periodo reproductivo. Esto se realizará a través la medición de los siguientes parámetros:

a) Medición de la incorporación de $^3\text{H-NE}$ en ratas controles y denervadas de 6 a 12 meses de edad en (Resultados 3.a) :

3.a.1 Ovario Completo

3.a.2 Ovario Residual

3.a.3 Células Ováricas

b) Medición de la liberación de $^3\text{H-NE}$ incorporada en ratas controles y denervadas de 6 a 12 meses de edad en (Resultados 3.a):

3.a.1 Ovario Completo

3.a.2 Ovario Residual

3.a.3 Células Ováricas

2.- Determinar la participación de transportadores específicos para catecolaminas involucrados en la incorporación de $^3\text{H-NE}$ en el ovario de ratas controles y denervadas de entre 6-12 de edad, en presencia y ausencia de cocaína en (Resultados 3.b):

3.b.1 Ovario Completo

3. b.2 Ovario Residual

3.b.3 Células Ováricas

3.- Determinar la localización celular de DAT y SNAP-25 en el ovario de rata al final del periodo reproductivo (Resultados 3.c):

A) Snap-25 como marcador de acoplamiento vesicular en el plasmalema.

B) DAT como marcador de transportador de catecolaminas

2.1 Animales

2.1.1 Ratas Sprague-Dawley Controles

Se utilizaron ratas hembras Sprague-Dawley, provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Las ratas fueron mantenidas a temperatura constante (21 °C) con ciclo luz-oscuridad controlado (luz desde las 7:00 hasta las 19:00 horas, y oscuridad desde las 19:00 hasta las 7:00 horas) y con alimento y agua a libre disposición.

2.1.2 Ratas Sprague-Dawley Denervadas (SONX)

Con el propósito de aislar el ovario del componente simpático y así poder estudiar el comportamiento del componente interno del ovario, se realizó una sección quirúrgica del nervio ovárico superior. Ésta se llevó a cabo mediante una aproximación dorsal, en animales anestesiados con Ketamina (90mg/Kg) y Xilazina (10mg/Kg) bajo supervisión veterinaria. Los animales fueron mantenidos por 16-17 días, tiempo en el cual aún no existe re-inervación simpática.

Todos los procedimientos experimentales realizados en el presente trabajo de título, se encuentran aprobados por el comité de ética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile y el comité de ética de Conicyt.

2.1.3 Creación de grupos experimentales

Utilizando ambos grupos de animales (Controles y SONX), se generaron grupos experimentales según criterio de edad, estando cada grupo conformado por 16 ratas, los cuales a su vez fueron divididos en 8 Controles y 8 Desnervadas (SONX). Resultando en los siguientes grupos experimentales:

- a) 16 Ratas de 5 a 6 meses de edad
- b) 16 Ratas de 8 meses de edad
- c) 16 Ratas de 10 meses de edad
- d) 16 Ratas de 12 meses de edad

Luego, tanto para el grupo control, como para el grupo SONX, se realizó una subdivisión de los grupos, separando entre Ovarios Completos (4 ratas) y Ovarios residuales + Células ováricas (4 ratas) (fig. 2).

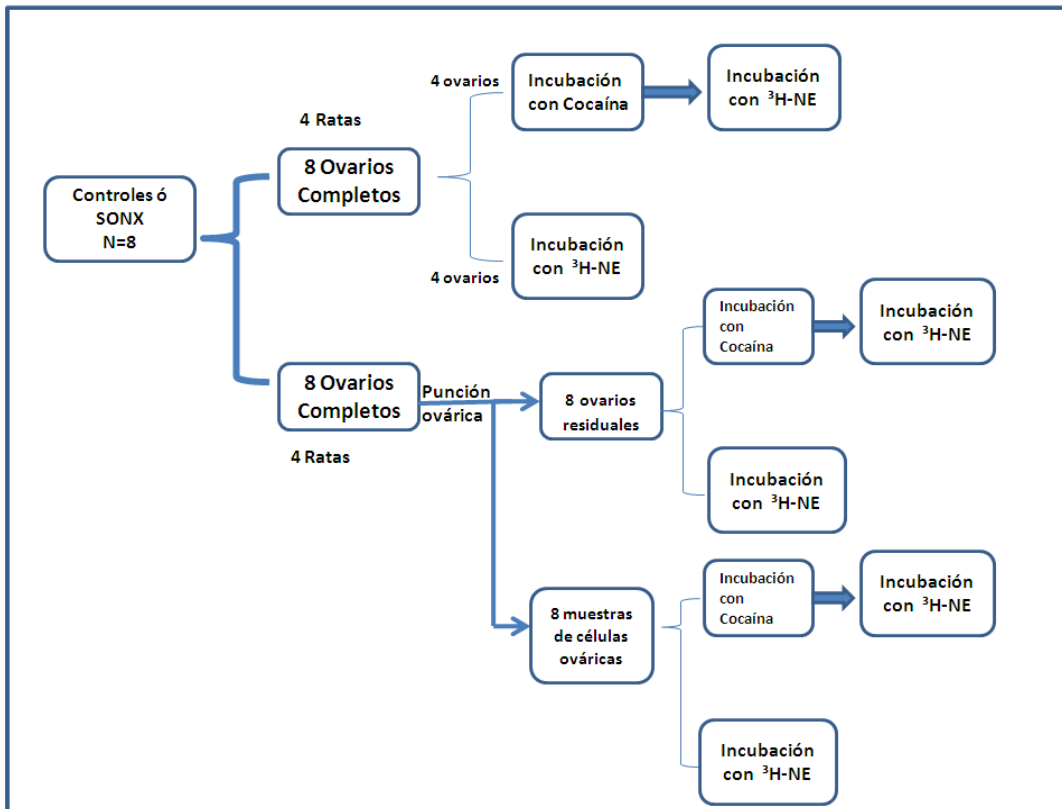


Figura 2: Esquema general de utilización de animales y tejido ovárico, ejemplificando la mitad de un grupo etario completo (controles o SONX), hasta la etapa de de incubación con ³H-NE.

2.2.1 Utilización de tejidos

Todos los experimentos contemplados en este trabajo se remiten a la utilización y extracción de ambos ovarios, tanto de ratas controles como de SONX.

Para fines prácticos y como se mencionó, los ovarios fueron tratados de 3 maneras distintas, independientemente si fueron extraídos de ratas controles o denervadas: 1° Como ovario completo, que representa todo tipo celular con actividad nerviosa que posea el ovario. 2° Como células obtenidas por punción, que representa principalmente células granulosas y/o lúteas. 3° Como tejido residual (ovario residual) a la punción ovárica, que representa aquellas células ubicadas en el intersticio ovárico ya sean de origen extrínseco o intrínseco.

La extracción de ovarios para cada grupo etario, así como para controles y SONX, se realizó de una misma manera, la que se describe a continuación:

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación, luego se realizó un corte en la línea abdominal, para exponer los ovarios. Estos fueron extraídos procurando separar todo el tejido adiposo y el oviducto. Una vez extraídos, ambos ovarios fueron pre incubados a 37°C por 10 minutos en buffer Krebs bicarbonato (BK), (NaCl 108 mM, KCL 4,53 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄ 10 mM, NaHCO₃ 24,25 mM, CaCl₂ 2,5 mM, glucosa 25 mM, ácido ascórbico 0,6 mM, EDTA 30,1 μM).

Durante todo el experimento y con el propósito de mantener un pH del buffer entre 7,2-7,4, se mantuvo un burbujeo constante con una mezcla de CO₂ /O₂ (95/5 %).

En todos los experimentos realizados, un ovario de la rata (ya sea en forma de ovario, células ováricas u ovario residual) fue utilizado como control y el otro estuvo en presencia de cocaína, para de esta forma poder compararlos entre ellos.

Los tratamientos siguientes a los que fueron sometidos los tejidos, difieren entre sí, siendo detallados a continuación.

2.2.1 a Liberación *In vitro* de ³H -Norepinefrina en ovario completo inducida con BKK+ en presencia y ausencia de Cocaína.

De manera posterior a la pre-incubación antes señalada, cada ovario fue incubado en 1 ml de BK con una concentración de 2 µl/ml de ³H-NE (levo-[2,5,6-³H]-Norepinefrina, 52 Ci/mmol, NEN, Perkin Elmer Life Sciences, Inc), por 30 min a 37°C(21) . En el caso de aquellos ovarios destinados a la observación del bloqueo de transportadores catecolaminérgicos por presencia de cocaína, ésta se agregó 10 minutos previos a la³H-NE, quedando en una concentración final de 10 µM. Posteriormente, el exceso de ³H-NE se eliminó con 6 lavados de 10 min cada uno con BK. Para aquellos ovarios tratados con cocaína y con el objetivo de impedir la re-incorporación de ³H-NE, los dos primeros lavados se realizaron en presencia de cocaína 10 µM.

Luego de los lavados, los ovarios fueron puestos en una placa con 24 pocillos distribuidos en 4 filas de 6 pocillos cada una. Los primeros 3 contienen 2 ml BK normal y corresponden a los basales experimentales, el cuarto contiene 2 ml buffer Krebs-potasio 80 mM (BKK+), el cual se obtiene por el aumento de KCl a 80 mM, a expensas de una disminución equivalente de NaCl, con el objetivo de mantener la osmolaridad y concentración de cloruros constante. Este buffer sirve como estímulo depolarizante homólogo a un impulso eléctrico, que permite la liberación de catecolaminas (³H-NE) desde los terminales nerviosos del ovario. Los últimos 2 pocillos contienen BK normal y constituyen los post-estímulos. De esta manera, cada ovario se hizo pasar en forma serial por los 6 pocillos, permaneciendo un minuto en cada uno. Luego el tejido fue homogenizado en 1 ml de ácido perclórico (PCA) 0,4 N. Finalmente para cuantificar la radiactividad se tomaron 600 µL de cada pocillo que se diluyeron en 4 ml de mezcla de centelleo (*Ecoscint* , National diagnostic, USA Atlantic, Georgia), solución a la que finalmente se le contó la radiactividad en el contador-β (Packard Liquid Scintillation Analyzer 1600TR; 72, 50% eficiencia para ³H) (Fig. 3).

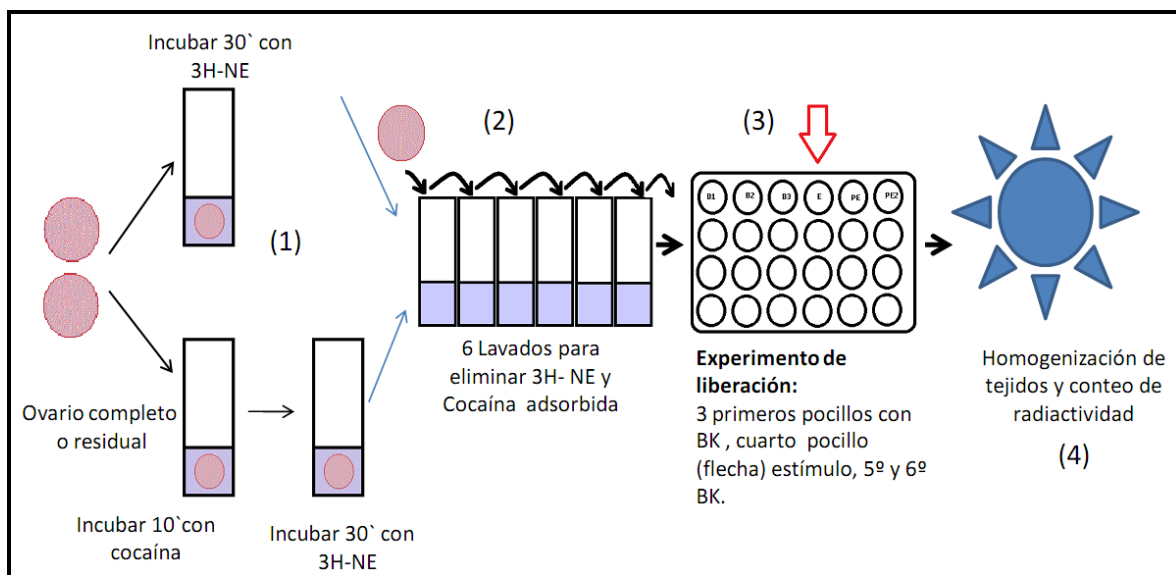


Figura 3, Esquema de liberación utilizado para ovarios completos y residuales en presencia y ausencia de cocaína: Aquí se muestran todos los procesos realizados luego de la pre-incubación con buffer Krebs, considerando la incubación con $^3\text{H-NE}$ y luego cocaína (1), lavados (2), etapa experimental (3) y cuantificación de radiactividad (4).

2.2.1 b Liberación *In Vitro* de ^3H -Norepinefrina en Células ováricas inducida con BKK+ en presencia y ausencia de Cocaína

Con el fin de analizar la capacidad de liberación de NE por parte del componente celular del ovario, éste fue aislado del resto de las estructuras ováricas (22). Para dicho objetivo, los ovarios fueron pinchados con una aguja sobre un pocillo de vidrio que contenía 150 μL de BK. Al pinchar el ovario aleatoriamente, se obtiene una suspensión celular enriquecida en células granulosas y lúteas. El tejido ovárico restante luego de las repetidas punciones, se le ha denominado Ovario Residual, y también será tratado como muestra experimental (ver sección 2.2.1.c).

El procedimiento se realizó sobre ambos ovarios de cada animal, obteniendo así un pool de células ováricas de 300 μL , el cual se mezcló por agitación manual para luego ser separado en dos muestras iguales de 150 μL . Luego, a cada muestra se le agregaron 50 μL de $^3\text{H-NE}$ 1uL/ 200uL y se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 30 min. En el caso de las muestras tratadas con cocaína, ésta se agregó 10 minutos antes de la $^3\text{H-NE}$ y se ajustó a una concentración final de 10 μM .

Pasado el proceso de incubación, cada muestra de suspensión celular fue centrifugada a 3600xg por 5min y el sobrenadante fue guardado a 4°C hasta la cuantificación de la radiactividad. El pellet celular fue resuspendido en 150µl BK y centrifugado a 3600xg por 5min de manera de arrastrar la radiactividad adsorbida. Este procedimiento se repitió 5 veces y en cada ocasión los sobrenadantes fueron guardados a 4°C para su cuantificación. A continuación, para semejar un estímulo eléctrico, el pellet fue resuspendido en 150 µl de BKK+ y se procedió a centrifugar como se señala anteriormente. Finalmente el pellet fue resuspendido en 150 µl de Krebs normal. Se procedió igual que en los pasos anteriores y el pellet final fue r-suspendido en 150µl de PCA 0,4 N y se contó la radiactividad, para lo cual se tomaron los 150 µl de cada muestra y se mezclaron con 450 µL de agua y 4 ml de mezcla de centelleo (fig. 4). Para la expresión de resultados se consideró como basal el lavado 5, debido a que se alcanza un estado estacionario en la cantidad de radiactividad presente en las células (ver Anexo 1)

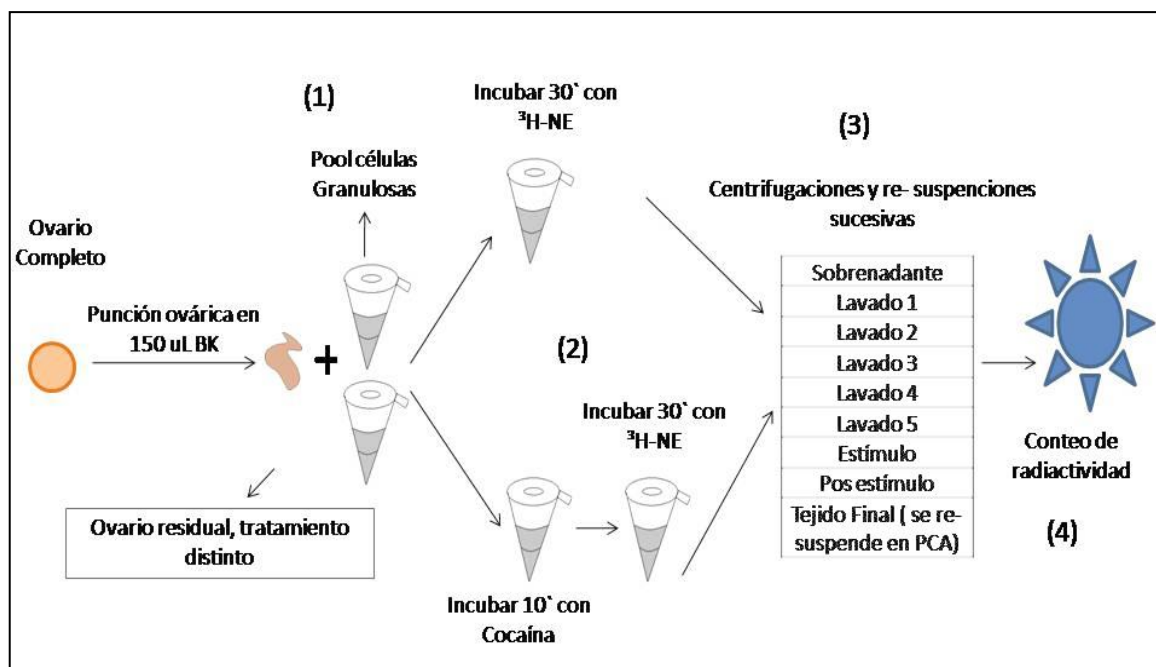


Figura 4, Esquema protocolo de liberación de $^3\text{H-NE}$ en células ováricas en presencia y ausencia de cocaína, realizado en series experimentales de ratas de 6, 8 10 y 12 meses: Una vez extraídos los ovarios son pinchados y extraídas las células (1). Luego son incubadas con $^3\text{H-NE}$ (2) y cocaína cuando corresponde. Posteriormente las células centrifugadas y re-suspendidas en BK sucesivamente (3). Finalmente las células son re-suspendidas en PCA y se cuentan todas las muestras (4).

2.2.1.c Liberación *In Vitro* de ³H -Norepinefrina en ovario residual inducida con BKK+ en presencia y ausencia de Cocaína

Simultáneamente, mientras se realiza el protocolo de liberación de células ováricas, el tejido restante, u ovario residual, fue sometido al protocolo de liberación, en exactamente las mismas condiciones que el ovario completo. Por lo que el protocolo es el descrito en el punto 2.2.1.a

2.2.2 Inmunohistoquímica

2.2.2 a. Fijación de tejidos

Previa a la realización de esta memoria de título, el laboratorio poseía en stock cortes de ovarios provenientes de ratas controles de distintas edades (6 y 10 y 14 meses) los cuales fueron disecados y fijados en formalina tamponada al 10 % por 12 hrs a temperatura ambiente para luego ser enjuagados cuatro veces en PBS por 10 min. Posteriormente se incluyeron en parafina, se cortaron en secciones de 6 µm y se montaron sobre portaobjetos silanizados.

2.2.2 b Incubación con anticuerpos específicos

Las secciones de tejido fueron desparafinadas sucesivamente en una batería de xilol (100%, 2 veces, 5min cada vez), etanol (100%, 2 veces, 5min cada vez), etanol (100%, 80%, 70%, 5 min cada vez). Se bloqueó la actividad peroxidasa por 20 min a temperatura ambiente con solución de metanol 9%, peróxido de hidrógeno 6,3% (Merck) en PBS 10mM. Posteriormente las secciones se sometieron a tratamiento de recuperación antigénica en tampón citrato (1,8mM ácido cítrico, 8,2mM citrato de sodio, pH 6,0) a 90°C por 30min más 20min de enfriamiento en la misma solución. A continuación las secciones se incubaron con el primer anticuerpo a 4°C durante toda la noche (24). Rabbit anti-rat Dopamine Transporter (DAT) (Alpha Diagnostic Intl. Inc. San Antonio, TX, USA, 1:200) y Rabbit anti-rat Snap-25 (Abcam 1:200). Posteriormente se incubó con anticuerpo secundario específico (gamma globulina biotinilada anti-rabbit y anti-mouse; 1:200)

(Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA), complejo avidina-biotina, peroxidasa (ABC, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA) y finalmente se desarrolló color con DAB (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA.). Las secciones fueron observadas mediante un microscopio de luz Olympus CX-31 y fotografiadas digitalmente (Olympus U-TVO.5XC3).

2.3 Expresión de resultados

Con el objeto de minimizar la variabilidad debido a manipulación de los tejidos y/o diferencias en la liberación basal de estos, los resultados de los experimentos de liberación se expresaron en cuentas por minuto (cpm), unidad de medida relativa a la radiactividad, obteniendo así datos directos que sólo serán corregidos de acuerdo a volumen total. Con el mismo objeto de disminuir la variabilidad, tanto a ovarios residuales como a ovarios completos se les analizaron los resultados obtenidos del segundo y tercer basal, el estímulo, un post- estímulo y el tejido homogenizado. En el caso de las células, se analizaron el quinto basal (lavado 5), el estímulo, el post-estímulo y las células restantes (Anexo 1).

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los experimentos de liberación, se hizo en base al test de varianza ANOVA de una vía con un 95 % de confianza, junto con un post-test de Bonferroni a pares de columnas. Para datos no pareados, se realizó el test “t-student” con la misma confianza. La desviación a la media de los resultados se representa como error estándar. Para estos análisis se utilizó el Software *GraphPad Prisma 5 (1992-2007 GraphPad Software, Inc. All rights reserved)*.

Para los análisis de significancia en todos los experimentos, utilizando distintos símbolos, se definió: Un símbolo $p < 0,05$; Dos símbolos $p < 0,01$; Tres símbolos $p < 0,001$

3.a.1 Incorporación y liberación de $^3\text{H-NE}$ en ovario completo

Los experimentos de incorporación y liberación de $^3\text{H-NE}$, hacen referencia al primer objetivo de este trabajo, donde se mide la capacidad de incorporación de $^3\text{H-NE}$ en ovarios completos de ratas controles y denervadas de 6, 8, 10 y 12 meses de vida.

Los resultados en ovarios de ratas controles, mostraron que no hubo diferencias estadísticamente significativas en la incorporación de $^3\text{H-NE}$ en ovarios de ratas de 6, 8 y 12 meses, obteniéndose una incorporación promedio de 72.000 cpm a éstas edades. Sin embargo, en ovarios de ratas de 10 meses la incorporación de $^3\text{H-NE}$ fue significativamente mayor y bordeó las 120.000 cpm. Al evaluar la capacidad de incorporación de $^3\text{H-NE}$ del componente nervioso intrínseco del ovario, utilizando ovarios de ratas SONX, se observó que entre los 6 y 10 meses de vida la incorporación de $^3\text{H-NE}$ bordeó las 15.000 cpm, siendo entre un 70-80% menor a la observada en ovarios control. Por otro lado, a los 12 meses de edad, los ovarios denervados alcanzaron una incorporación de 60.000 cpm, representando una disminución de sólo un 32% en la incorporación de $^3\text{H-NE}$ con respecto a los ovarios de 12 meses sin denervar. (Fig.5)

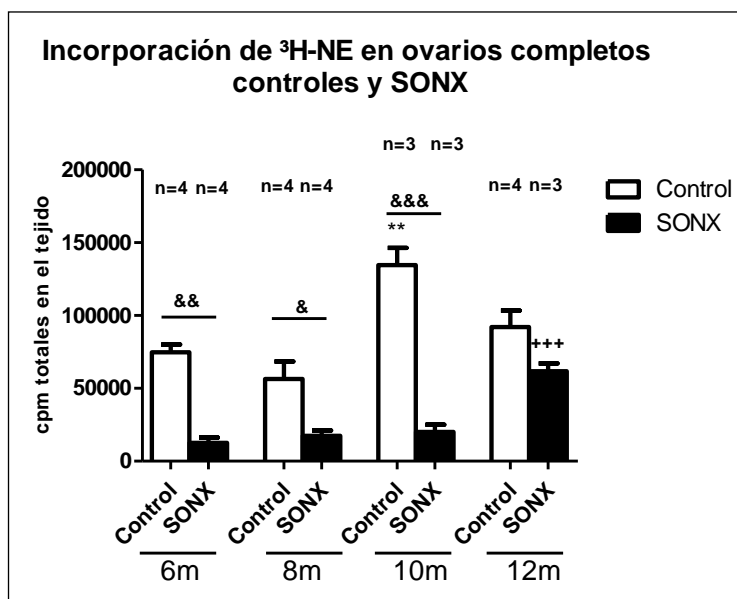


Figura 5, Incorporación de $^3\text{H-NE}$ en ovarios completos controles y SONX: A medida que la rata envejece, el ovario aumenta su capacidad de incorporar $^3\text{H-NE}$ en ratas controles (barras blancas). Además se observa como la denervación (barras negras) disminuye esta capacidad, aunque a los 12 meses el efecto tiene un menor impacto. Resultados expresados como promedio de cpm incorporadas \pm E.E. (*)Controles/control de 6 m. (+)SONX/SONX de 6 m. (&)Control/SONX cada edad.

Liberación en ovario completo

Luego, con el objeto de observar si existe una relación entre la incorporación de $^3\text{H-NE}$ y la capacidad de liberarla que tiene el ovario frente a un estímulo depolarizante de K^+ 80 mM, se realizaron estudios de liberación en ovarios de ratas controles y denervadas, utilizando como control experimental los ovarios de ratas de 6 meses, edad donde la fertilidad del animal es máxima, para luego decaer en los meses posteriores (6).

Los resultados de liberación revelaron que en ovarios de ratas controles y SONX de 6 meses no se logró detectar liberación de $^3\text{H-NE}$ aún cuando ésta se incorpora adecuadamente. (Fig.6). Luego y con respecto al sexto mes, los ovarios de ratas controles de 8, 10 y 12 meses de vida, aumentaron significativamente su capacidad de liberar norepinefrina exógena. Además, el pico de liberación observado a los 10 meses de vida se relacionó directamente con el pico de incorporación visto a la misma edad.

Al realizar los estudios de liberación en ovarios de ratas denervadas, se detectó en primer lugar una disminución en la liberación basal (entendiéndose ésta como la liberación de $^3\text{H-NE}$ realizada espontáneamente por el ovario y sin un estímulo depolarizante) la cual fue cerca de un 50% inferior a la observada en ovarios controles, relacionándose directamente con lo observado en experimentos de incorporación. La aplicación de un estímulo de BKK^+ , reveló que existe liberación significativa de $^3\text{H-NE}$ con respecto a los 6 meses, sólo al décimo y duodécimo mes de vida (Fig.7). Debido a que la denervación disminuye la liberación basal de los tejidos, la comparación de la liberación de $^3\text{H-NE}$ se realizó considerando el área bajo la curva de liberación en cpm. Así, en ovarios de ratas controles se observó que a partir del octavo mes de vida comienza a aumentar la capacidad de liberación de norepinefrina exógena en el ovario, alcanzando un pico al décimo mes (3.092 ± 1.435 cpm) el cual tiende a disminuir en el duodécimo mes de vida (2.608 ± 430 cpm). Por otro lado, ovarios de ratas denervadas aumentan su capacidad de liberación a partir del décimo mes (1.348 ± 192 cpm), disminuyendo significativamente al duodécimo mes (593 ± 386 cpm). De esta manera, se observa que al final del período reproductivo de la rata, el ovario aumenta su capacidad de liberar $^3\text{H-NE}$ incorporada, y cuando éste se denerva, queda una capacidad de liberación que alcanza el 30 % del total a los 10 meses.

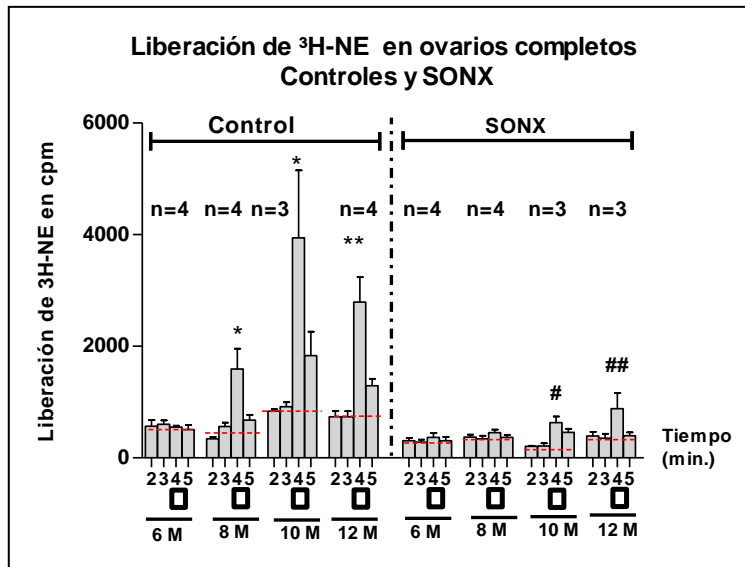


Figura 6, Liberación de ³H-NE en ovarios completos controles y SONX: El gráfico muestra la liberación de ³H-NE en cpm v/s tiempo, donde se observa la condición basal (números 2,3), bajo estímulo (cuadro negro) y post estímulo (número 5) al cual se sometieron ovarios completos. A la izquierda se muestran la liberación de ovarios obtenidos desde ratas controles y a la derecha de ratas denervadas. Resultados expresados como el promedio de cpm liberadas ± E.E. (*) Estímulo Controles / Estímulo Control 6 meses. (#) Estímulo SONX / Estímulo SONX 6 meses

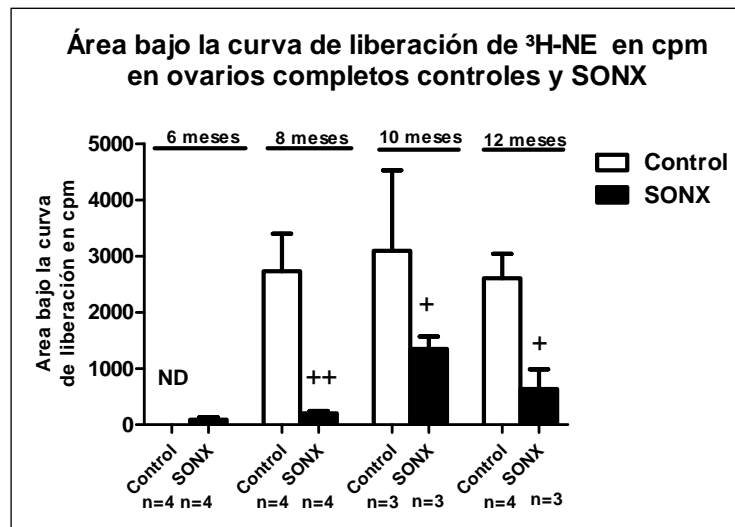


Figura 7, Área bajo la curva de liberación de ³H-NE en ovarios completos controles y SONX: La figura muestra la liberación neta obtenida de ovarios controles (barras blancas) y denervados (barras negras) para las distintas edades. Se observa que al envejecer los ovarios aumentan su capacidad intrínseca de responder frente a un estímulo iónico, liberando ³H-NE. Resultados expresados como promedio de cpm liberadas ± E.E. (+) Control / SONX para cada edad. ND = No Detectado

3.a.2 Incorporación y liberación de $^3\text{H-NE}$ en Células ováricas

El protocolo utilizado en esta etapa corresponde al probado en la obtención de células de la granulosa para posteriores ensayos de incorporación y liberación de $^3\text{H-NE}$ en ratas pre-púberes (22), periodo al cual, las células mostraron la capacidad de incorporar y liberar $^3\text{H-NE}$. De esta manera, las técnicas experimentales han sido extrapoladas al tratamiento en ratas adultas en el final del período reproductivo.

La evaluación de la capacidad de incorporación de $^3\text{H-NE}$ en células ováricas procedentes de ratas controles, mostró variaciones según la edad. Así, entre los 6-8 meses de vida las células incorporaron un promedio de 30.000 cpm sin diferencias significativas. Luego, a los 10 meses, las células experimentaron una significativa disminución en la capacidad de incorporar $^3\text{H-NE}$ (7.292 ± 1.874 cpm), para finalmente, a los 12 meses restablecer ésta capacidad y alcanzar una incorporación de 44.564 ± 3.068 cpm de $^3\text{H-NE}$ (Fig.8).

En células procedentes de ovarios denervados se observó que la denervación disminuye la incorporación de $^3\text{H-NE}$. Así, entre los 6-8 meses de vida, las células de ratas SONX incorporaron un promedio de 12.000 cpm sin diferencias significativas entre ellos, representando cerca de un 30% de lo incorporado por las células de ratas controles. Luego, a los 10 meses las células de ratas SONX incorporaron 11388 ± 2730 cpm lo que no implicó diferencias significativas con lo observado en células de ratas controles de la misma edad. Por último, a los 12 meses las células ováricas de ratas SONX incorporaron 25.397 ± 5.676 cpm de $^3\text{H-NE}$, representando un 57% de lo incorporado por células ováricas procedentes de ratas controles (Fig.8).

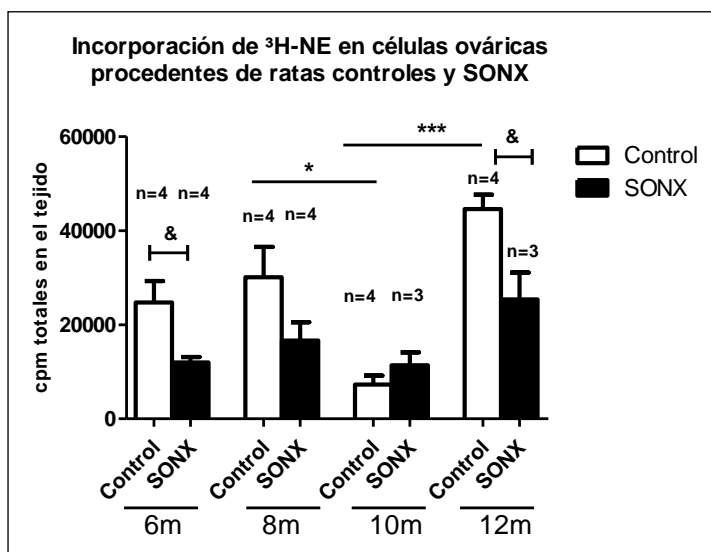


Figura 8, Incorporación de ³H-NE en células ováricas procedentes de ratas controles y SONX: La figura muestra la ³H-NE incorporada por células ováricas de ovarios controles (barras blancas) y SONX (barras negras). Resultados expresados como promedio de cpm incorporadas \pm E.E. (*)Controles/Controles. (&) Controles / SONX para cada edad.

Liberación de ³H-NE en Células Ováricas

La evaluación de la capacidad de liberación de ³H-NE de células procedentes de ovarios de ratas controles, mostró un perfil fluctuante y concordante al observado durante la incorporación de NE de dichas células. Además, se observa que la denervación inhibe completamente la capacidad de liberación de las células, aún cuando éstas han incorporado ³H-NE (Fig.9).

La cuantificación de la liberación de ³H-NE (área bajo la curva de la liberación) se muestra en el gráfico 6, donde se observa que células ováricas procedentes de ovarios de ratas controles tienen un primer pico de liberación a los 8 meses de vida (2625 ± 567 cpm) el cual disminuye drásticamente a los 10 meses (310 ± 140 cpm), para finalmente a los 12 obtener un segundo pico de liberación (1.468 ± 327 cpm), el cual no es completamente concordante con la mayor incorporación de ³H-NE observada a la misma edad.

Considerando estos resultados, se verifica que células principalmente de origen folicular no justificarían la creciente capacidad de incorporación y liberación ³H-NE observada al final del periodo reproductivo en ovarios completos cuando éstos carecen de inervación simpática extrínseca.

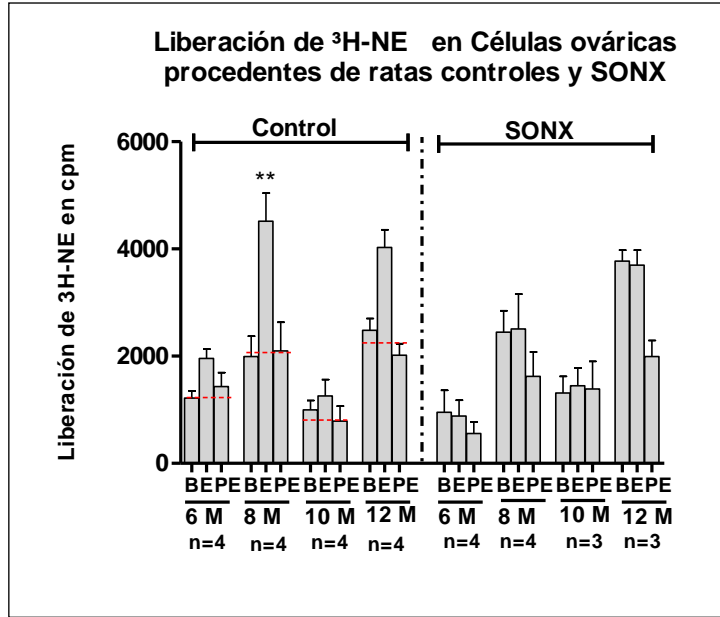


Figura 9, Liberación de ³H-NE en células ováricas procedentes de ratas controles y SONX: El gráfico muestra la liberación de ³H-NE v/s los tiempo. A la izquierda se muestran las células obtenidas desde ovarios de ratas controles y a la derecha de ratas denervadas. Se observa la condición basal (B) bajo estímulo (E) y post-estímulo (PE) al cual se sometieron las células ováricas. Resultados expresados como promedio de la liberación en cpm ± E.E. (*) Controles / Control de 6m

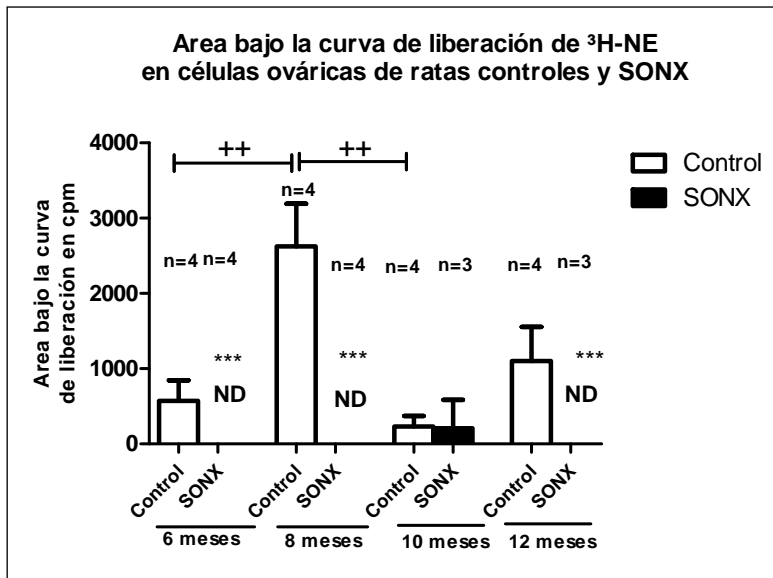


Figura 10, Área bajo la curva de liberación de ³H-NE en células ováricas de ratas controles y SONX: La figura muestra la liberación neta células ováricas obtenidas desde ovarios controles (barras blancas) y denervados (barras negras) para las distintas edades. Resultados expresados como promedio del área bajo la curva de la liberación en cpm ± E.E.

(*) Control/ SONX para cada edad.

(+)Controles / Controles. ND=No detectado

3.a.3 Experimentos de incorporación y liberación de $^3\text{H-NE}$ en tejido intersticial (ovario residual)

Los resultados expresados a continuación evalúan el perfil incorporación y liberación de $^3\text{H-NE}$ que posee el ovario residual.

Al evaluar la incorporación de $^3\text{H-NE}$ en el tejido intersticial procedente de ratas controles, observamos que al octavo mes el tejido incorporó 139.312 ± 11.354 cpm, luego al décimo mes se incorporó 246.467 ± 22.121 cpm y al duodécimo mes incorporó 188.075 ± 11.800 cpm, demostrando que existe en forma un aumento sostenido en la incorporación de $^3\text{H-NE}$ en el tiempo (Fig.11).

El análisis de la incorporación en el tejido intersticial procedente de ratas SONX, demostró que entre los 6-10 meses no existen diferencias estadísticamente significativas en la incorporación de $^3\text{H-NE}$ (Fig.11), promediando cerca de 30.000 cpm incorporadas. Esto representó una disminución equivalente al 70-80 % con respecto a lo incorporado por el tejido intersticial procedentes de ratas controles. Por el contrario, al duodécimo mes el tejido intersticial de ratas SONX incorporó 108.177 ± 35.732 cpm de $^3\text{H-NE}$, representando un aumento significativo en la capacidad de incorporación con respecto al resto de los tejidos denervados. Además, esta incorporación implicó una disminución de solo el 40% a lo observado en ovarios residuales de ratas controles al duodécimo mes (Fig.11).

Liberación de $^3\text{H-NE}$ en Tejido Intersticial

Con el objeto de analizar la relación existente entre la incorporación de $^3\text{H-NE}$ y la capacidad de liberarla frente a un estímulo de K^+ 80 mM, se llevaron a cabo los experimentos de liberación en el tejido intersticial.

Los resultados de éstos experimentos mostraron, que tanto en el tejido procedente de ratas controles como SONX, que el perfil de liberación del tejido intersticial es similar al observado en ovarios completos. Las similitudes también se reflejaron en la liberación basal de $^3\text{H-NE}$ del tejido intersticial, la cual para el tejido intersticial SONX fue cerca de un 50% menor que la vista en el tejido intersticial control (Fig.12).

De esta manera, y observando la liberación neta (área bajo la curva de liberación en cpm) en l figura 12, se evidencia al igual que en ovarios completos, que al sexto mes no se logra detectar liberación de $^3\text{H-NE}$. A pesar de esto, se observó que el tejido intersticial de ratas control tienen un aumento estadísticamente significativo en la capacidad de liberación de $^3\text{H-NE}$ a partir del octavo mes de vida (2.273 ± 668 cpm), manteniéndose al décimo (24.687 ± 3208 cpm), y duodécimo (6.351 ± 1.348 cpm) mes.

Los estudios utilizando ovarios residuales de ratas SONX, revelaron que esta condición disminuye significativamente la capacidad de liberación de $^3\text{H-NE}$ del tejido intersticial. Así, a los 8 meses el tejido liberó sólo 164 ± 119 cpm de $^3\text{H-NE}$, representando una disminución de un 90% con respecto a su equivalente control. Luego a los 10 meses el tejido liberó 5.921 ± 1.824 cpm, evidenciando un 76% de disminución con respecto a los controles de 10 meses. Finalmente, al duodécimo mes el tejido intersticial SONX liberó 2.073 ± 728 lo que representa una disminución del 67% con respecto a los controles de 12 meses.

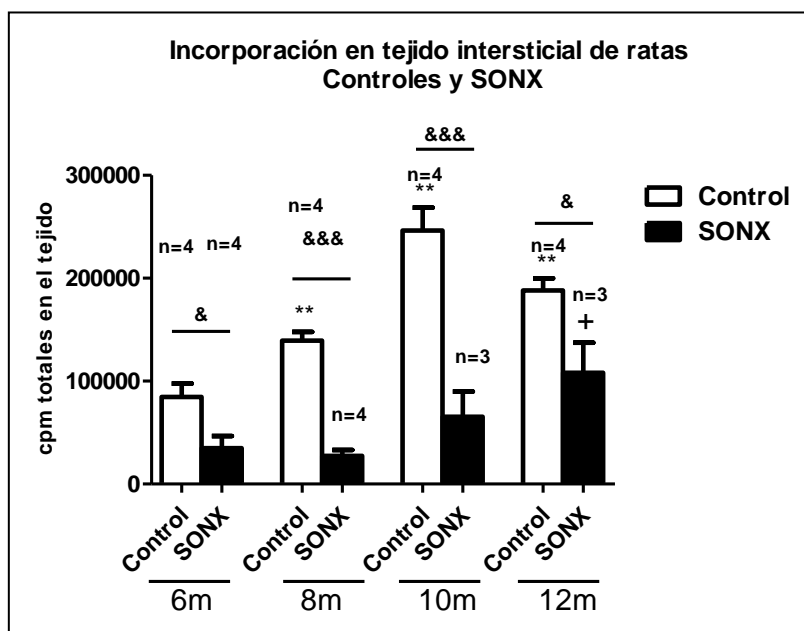


Figura 11, Incorporación de $^3\text{H-NE}$ en tejido intersticial de ratas controles y SONX. La figura muestra las cpm de NE incorporadas en ratas controles (barras blancas) y en ratas SONX (barras negras). Resultados expresados como cpm incorporadas \pm E.E. (*) Controles /Control 6 m. (+) SONX / SONX 6m. (&) Control/ SONX para cada edad.

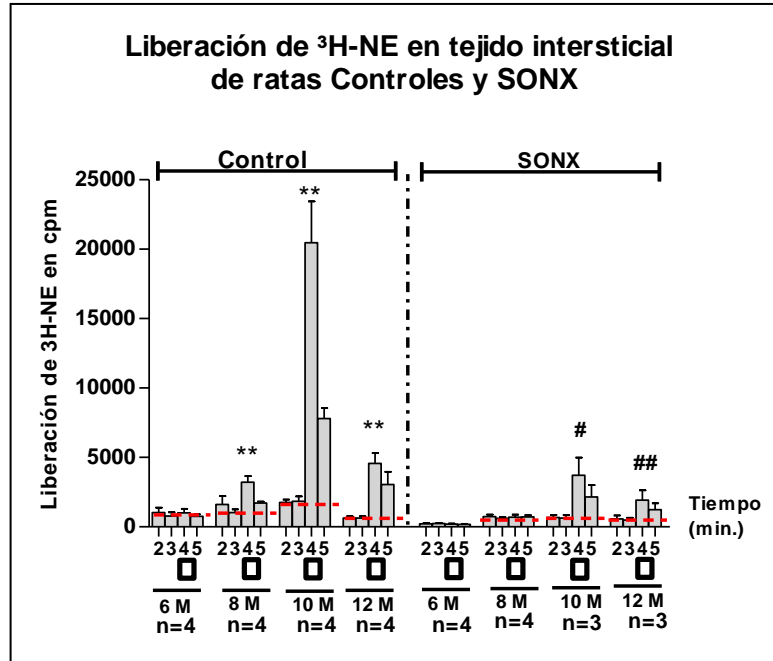


Figura 12, Liberación de NE en tejido intersticial de ratas controles y SONX. El gráfico muestra la liberación de $^3\text{H-NE}$ (cpm) v/s los tiempo, donde se observa la condición basal (números 2y 3) y bajo estímulo (cuadro negro) al cual se sometieron ovarios residuales. A la izquierda se muestran la liberación de ovarios obtenidos desde ratas contoles y a la derecha de ratas denervadas. Resultados expresados como cpm liberadas \pm E.E. (*)Estímulo de controles / Estímulo de control 6 meses. (#) Estímulo SONX / Estímulo SONX 6 meses

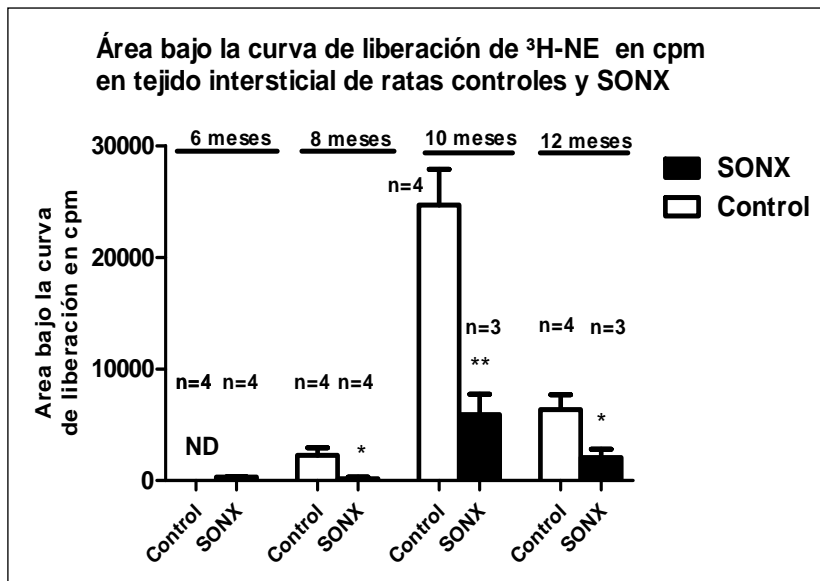


Figura 13, Área bajo la curva de liberación de NE en cpm en tejido intersticial de ratas controles y SONX La figura muestra el área bajo la curva de liberación de $^3\text{H-NE}$ en cpm obtenida de ovarios residuales controles (barras blancas) y denervados (barras negras) comparándola entre ellas en las distintas edades tratadas. Resultados expresados como promedio de área bajo la curva de cpm liberadas \pm E-E. (*) Control / SONX para cad edad.

3. b Estudio de transportadores de catecolaminas

Previamente demostramos que los tejidos analizados al final del período reproductivo de la rata tienen tanto la capacidad de liberar como de incorporar NE incluso cuando se encuentran denervados. Sin embargo, no hemos evaluado que la $^3\text{H-NE}$ haya sido incorporada a través de transportadores tipo nervioso, que para el caso son NET y DAT. Por esta razón y de acuerdo al objetivo dos del presente trabajo, los siguientes resultados muestran el efecto sobre la incorporación luego de que los tejidos han sido previamente incubados con cocaína, un potente y selectivo inhibidor de los transportadores señalados.

3.b.1 Transportadores en ovario Completo

Al analizar el efecto de la cocaína en ovario completo de ratas controles, se observa que a medida que el tejido aumenta su capacidad de incorporar $^3\text{H-NE}$, también aumenta el efecto inhibitorio de la cocaína (Fig.14). Así a los 6 meses, vemos que la inhibición alcanza sólo un 70%, sin embargo a los 10-12 meses cuando la incorporación es máxima, la inhibición por cocaína alcanza un 90%. Efecto similar se observa en ovarios denervados, donde a los 6 meses, cuando existe una mínima incorporación, el bloqueo sólo disminuye un 48% el contenido de $^3\text{H-NE}$. No obstante, a medida que avanzamos en el tiempo, el bloqueo alcanza un 79% de disminución a los 12 meses (Tabla 1)

Incorporación de $^3\text{H-NE}$ en Ovario Completo Control y Denervado : Efecto de bloqueo por Cocaína						
Edad	Control sin CC	Control Con CC	Disminución	SONX Sin CC	SONX Con CC	Disminución
6 m	74.713 \pm 6.564	22.585 \pm 5.888	70%	12.631 \pm 3.679	6.605 \pm 413	48%
8 m	56.483 \pm 11.900	5.747 \pm 840	90%	17.468 \pm 3.543	6.847 \pm 1274	60%
10 m	12.0235 \pm 21.969	12.163 \pm 2.737	90%	20.033 \pm 4.419	5.363 \pm 320	73%
12 m	92.088 \pm 11.262	13.845 \pm 2.631	86%	61.762 \pm 5.342	12.963 \pm 1646	79%

Tabla 1: La tabla muestra la incorporación de $^3\text{H-NE}$ en ovario completo control y denervado para las distintas edades, mostrando además para ambas condiciones la disminución en porcentaje en el contenido de norepinefrina incorporada al incubar y bloquear los tejidos en presencia de cocaína (CC). Los resultados se encuentran expresados como promedio de cpm incorporadas \pm Error estándar.

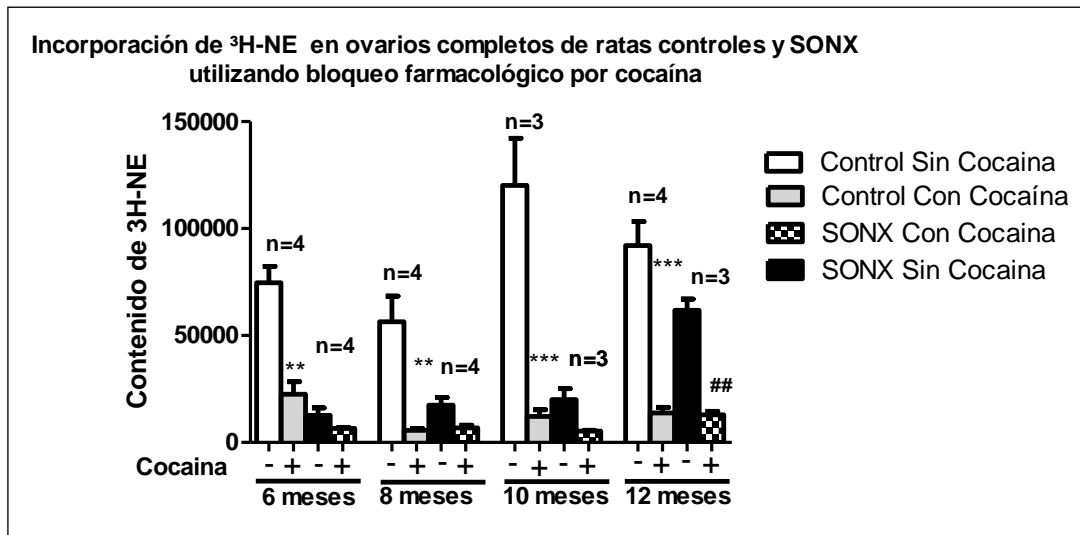


Figura 14, Incorporación de NE en ovarios completos de ratas controles y SONX utilizando bloqueo farmacológico pro cocaína. La figura muestra la incorporación $^3\text{H-NE}$ de ovarios completos controles (barras blancas) y de ovarios de ratas SONX (barras negras) al bloquear con cocaína (+) (barras grises y cuadriculadas respectivamente) para cada edad, dando cuenta de la posible implicancia de transportadores NET y DAT en la incorporación de catecolaminas. Resultados expresados como promedio de cpm incorporadas \pm E.E. ()Control sin CC/ Control con CC para cada edad. (#) SONX sin CC /SONX con CC para cada edad.*

3.b.2 Transportadores en Células ováricas

Como ya se mencionó, entre los 6-8 meses de vida las células obtenidas por punción procedentes de ratas controles, siguen un patrón de incorporación y liberación de $^3\text{H-NE}$ distinto al observado en ovario completo. Frente al bloqueo por cocaína, a esta edad la incorporación es bloqueada entre un 70-80%, corroborando resultados previos observados en ratas pre-púberes, donde se demostraba la presencia de transportadores NET y DAT. Sin embargo, a los 10 meses la inhibición de la incorporación no es evidente, lo que se corresponde con la baja incorporación sin bloqueo que presentan estas células (Figura 15). Finalmente, a los 12 meses, cuando la incorporación se restablece, el bloqueo por cocaína alcanza un 85% de efectividad (Tabla 2). Previamente, señalamos que la denervación afecta directamente la incorporación y liberación en células foliculares, sugiriendo una estrecha relación entre los componentes nerviosos extrínsecos e intrínsecos del ovario. A pesar de esto, los estudios de transportadores realizados en células procedentes de ratas SONX, muestran que según la edad, la cocaína es un efectivo bloqueador de la incorporación de

³H-NE, permitiendo pensar que, aunque la capacidad de liberación se vea inhibida, queda una capacidad de incorporación residual, la que se realizaría a través de transportadores específicos.

Incorporación de ³ H-NE en Células ováricas de ratas Controles y SONX : bloqueo por Cocaína						
	Control Sin CC	Control Con CC	Disminución	SONX Sin CC	SONX Con CC	Disminución
6 m	24.740 ± 5524	7.361 ± 780	70%	11.984 ± 1.118	5.121 ± 609	57%
8 m	30.089 ± 6440	5.397 ± 1.395	82%	16.634 ± 3.897	10.751 ± 3.383	----
10 m	7.292 ± 1874	6.672 ± 2.307	----	11.388 ± 2.730	2.508 ± 335	77%
12 m	44.564 ± 3068	6.737 ± 424	85%	25.397 ± 5.676	11.178 ± 2.593	56%

Tabla 2: La tabla muestra la incorporación de ³H-NE en células ováricas de ratas control y denervadas para las distintas edades, mostrando además para ambas condiciones la disminución en porcentaje en de contenido de Norepinefrina incorporada al incubar y bloquear los tejidos en presencia de Cocaína (CC). Los espacios en blanco señalan que no existió una disminución estadísticamente significativa. Los resultados se encuentran expresados como promedio de cpm incorporadas ± E.E.

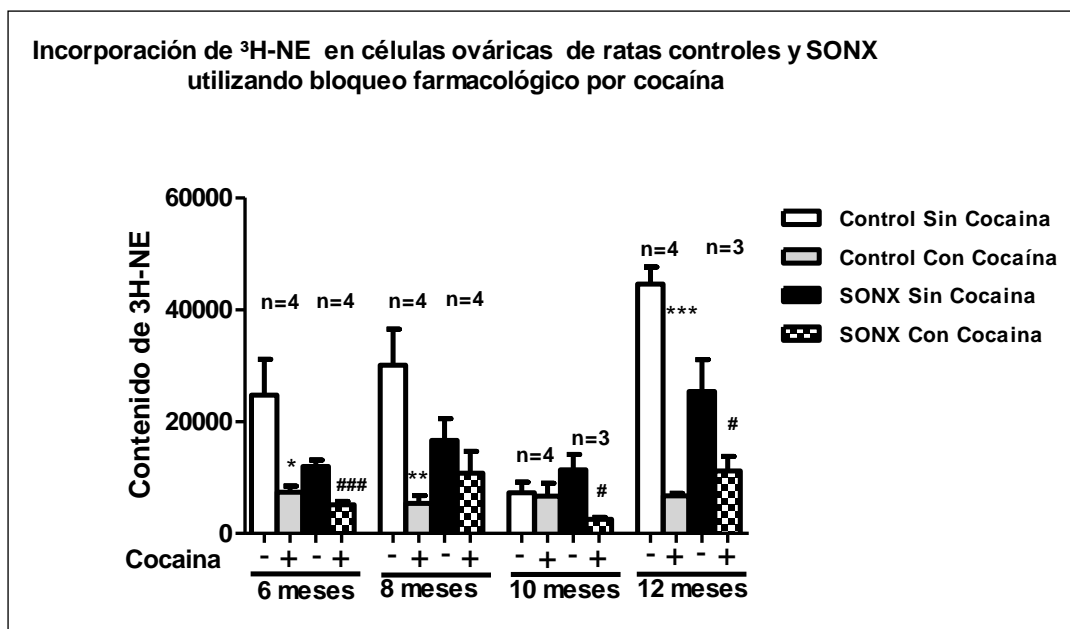


Figura 15, Incorporación de NE en células ováricas de ratas controles y SONX utilizando bloqueo farmacológico por cocaína. La figura muestra la incorporación de ³H-NE en células ováricas de ovarios controles (barras blancas) y de ovarios de ratas SONX (barras negras) al bloquear con CC (+) (barras grises y cuadriculadas respectivamente) para cada edad. Resultados expresados como promedio de cpm incorporadas ± E.E. (*) Control sin CC /Control con CC. (#) SONX sin CC /SONX con CC

3.b.3 Transportadores en Tejido intersticial

Los estudios de transportadores NET y DAT en ovarios residuales de ratas controles, mostraron que la cocaína inhibe significativamente la incorporación de Norepinefrina exógena en todos los grupos experimentales, promediando 20.000 cpm de $^3\text{H-NE}$ incorporada en forma independiente a la edad y sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Fig.16). En cuanto a la disminución de la incorporación, ésta fluctuó entre un 80-90% lo cual depende de la cantidad incorporada por el equivalente sin cocaína (Tabla 3). De la misma manera, la incorporación de $^3\text{H-NE}$ en el tejido ovárico intersticial de ratas SONX fue eficientemente bloqueada por cocaína, encontrándose a todas las edades un promedio de 10.000 cpm de $^3\text{H-NE}$ incorporadas por los tejidos, lo que en términos prácticos implica la casi nula incorporación de $^3\text{H-NE}$ para una liberación detectable. Esta inhibición de la incorporación, representó entre un 60-90% de disminución según lo incorporado sin el previo bloqueo por cocaína, siendo más evidente hacia el final del periodo reproductivo de la rata.

Incorporación de $^3\text{H-NE}$ (cpm) en ovario residual Control y SONX : Efecto de bloqueo por Cocaína						
	Control Sin CC	Control Con CC	Disminución	SONX Sin CC	SONX Con CC	Disminución
6 m	84.538 ± 11.354	15.493 ± 473	80%	34.834 ± 10.142	6.863 ± 1.284	80%
8 m	139.312 ± 8.639	27.563 ± 11202	80%	27.490 ± 5.717	10.083 ± 1.400	63%
10 m	246.467 ± 22.121	22.654 ± 3477	90%	65.462 ± 24.425	16.807 ± 5.802	----
12 m	188.075 ± 11.800	33.297 ± 9166	82%	10.8177 ± 35.732	10.831 ± 815	89%

Tabla 3: La tabla muestra la incorporación de $^3\text{H-NE}$ en ovario residual control y SONX para las distintas edades, mostrando además para ambas condiciones la disminución en porcentaje en de contenido de Norepinefrina incorporada al incubar y bloquear los tejidos en presencia de cocaína (CC). Los espacios en blanco señalan que no existió una disminución estadísticamente significativa. Los resultados expresados como promedio de cpm incorporadas ± E.E.

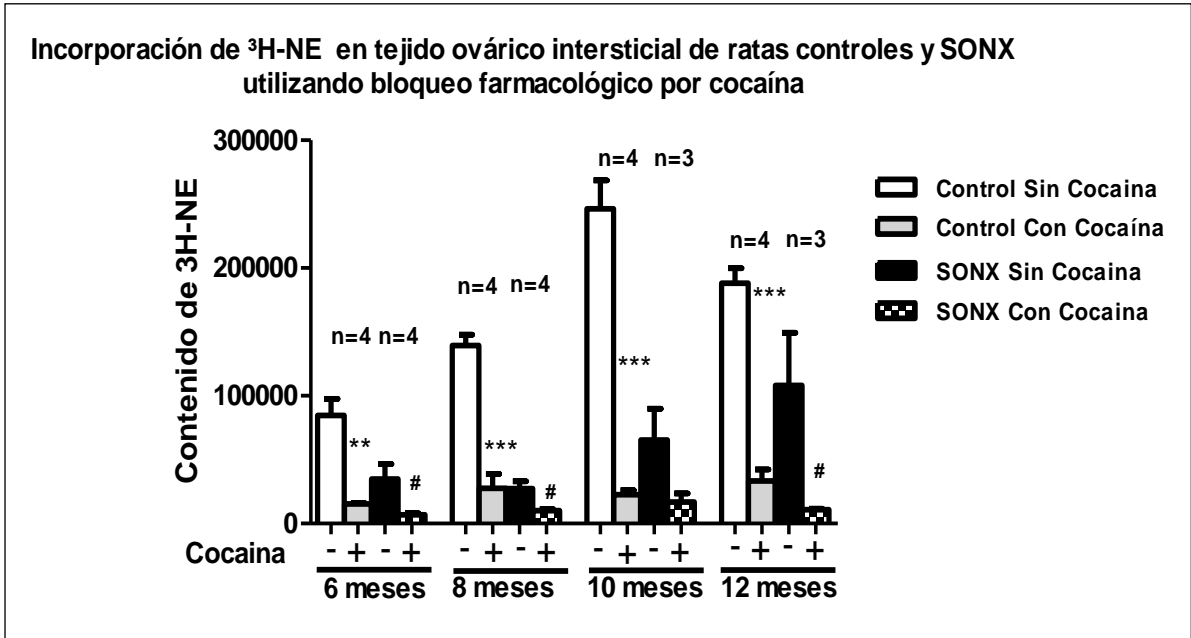


Figura 16, Incorporación en tejido ovárico intersticial de ratas controles y SONX utilizando bloqueo farmacológico por cocaína. La figura muestra la incorporación de $^3\text{H-NE}$ de ovarios residuales controles (barras blancas) y de ratas SONX (barras negras) al bloquear con CC (+) (barras grises y cuadrículadas respectivamente). De manera, se muestra la posible implicancia de transportadores NET y DAT en la incorporación de NE observada en el tejido intersticial. Resultados expresados como promedio de cpm incorporadas \pm E.E. (*)Controles sin CC /Controles con CC. (#)SONX sin CC /SONX con CC.

3.c Estudios inmunohistoquímicos de marcadores nerviosos

Los resultados expresados a continuación, son los concernientes al objetivo tres de este trabajo, donde se evalúa la presencia de los marcadores nerviosos DAT y Snap-25 en ratas controles de 6, 10 y 14 meses. Así, los siguientes resultados muestran la determinación inmuno-histoquímica y de carácter cualitativo de dos marcadores nerviosos, (a) el ya evaluado transportador de monoaminas DAT y (b) SNAP-25, una proteína de 25 Kd que participa en la exocitosis de neurotransmisores, interactuando directamente con Sintaxina y Sinaptobrevina, dos proteínas participantes del tráfico vesicular y acoplamiento con el plasmalema. De esta manera, utilizando ambos marcadores nerviosos, se infiere que la capacidad de incorporar y liberar NE exógena, se correlaciona con la maquinaria proteica equivalente a sistemas neuronales, y la cual pudiese estar presente y/o activa en el ovario hacia el final del periodo reproductivo de la rata.

Los resultados de estos experimentos muestran que a los 6 meses de edad existe marca positiva fuerte para Snap-25 y una de menor intensidad para DAT, las cuales se localizan tanto en el tejido intersticial como en células de la granulosa (Figura 17).

Luego, a los 10 meses de vida, las marcas positivas para DAT y Snap-25 se distribuyen de manera fuerte y similar en células de la granulosa, tejido intersticial y células lúteas (Figura 18).

Finalmente, a los 12 meses de vida se observan marcas inmunorreactivas para ambos antígenos, localizadas tanto en intersticio como en células de la granulosa y a cuerpos lúteos del ovario (Figura 19). Este hecho se correlaciona con lo observado en las pruebas fisiológicas, donde a los 12 meses tanto células intersticiales como células ováricas poseen la capacidad de incorporar y liberar de $^3\text{H-NE}$.

3. c.1 Inmunorreactividad de DAT y Snap-25 en cortes de ovario para ratas de 6 meses

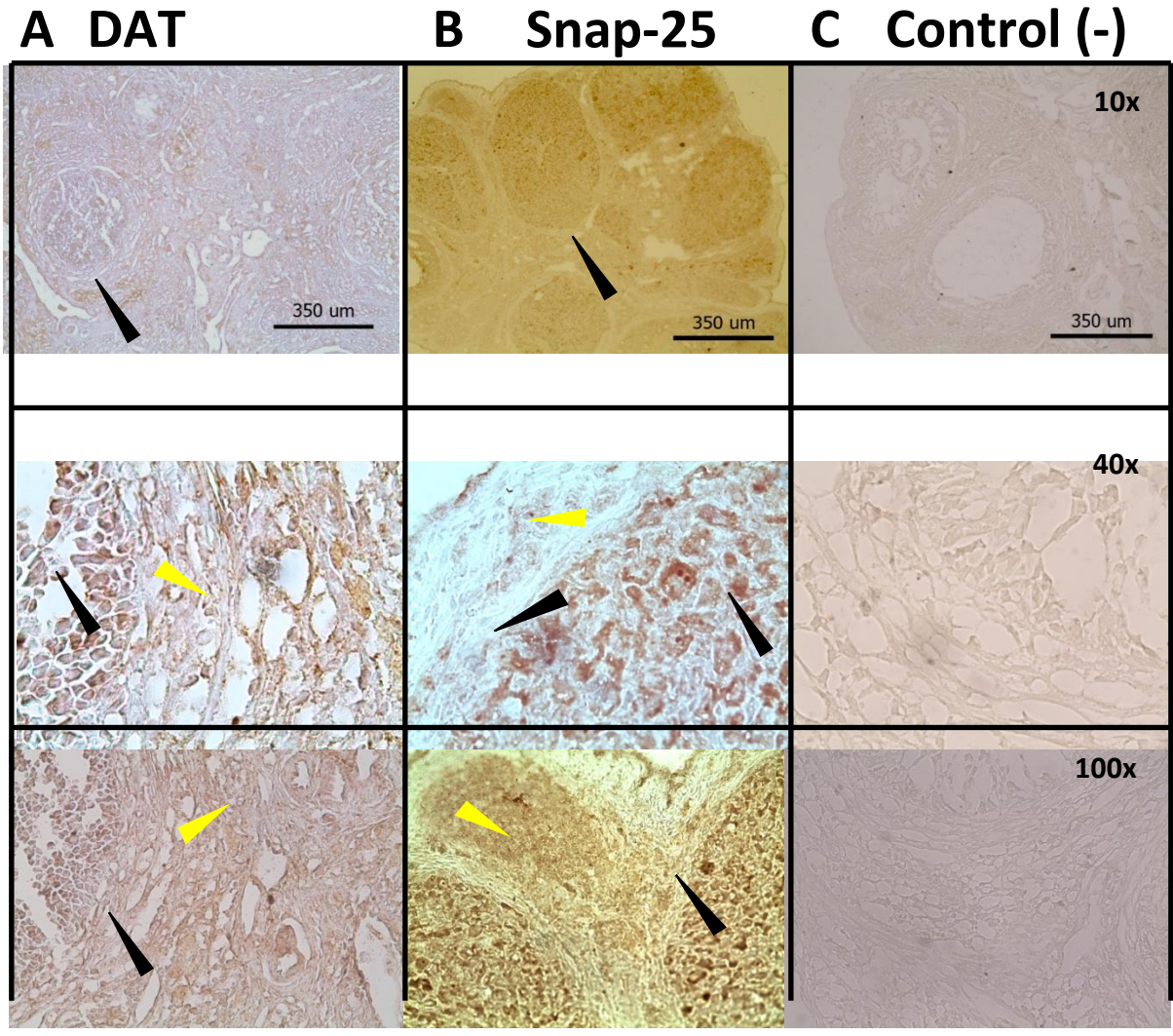


Figura 17. La figura muestra presencia de DAT (A) y Snap-25 (B) versus el control negativo (C) (solo anticuerpo secundario). Ambos antígenos marcan de manera considerable la zona intersticial (flecha negra) y células de la granulosa (flecha amarilla). Los cortes se muestran a distintos aumentos consecutivos de arriba hacia abajo, siendo el primero 10X, el segundo 40X y el tercero 100X.

3. c.2. Inmunorreactividad de DAT y Snap-25 en cortes de ovario para ratas de 10 meses de vida

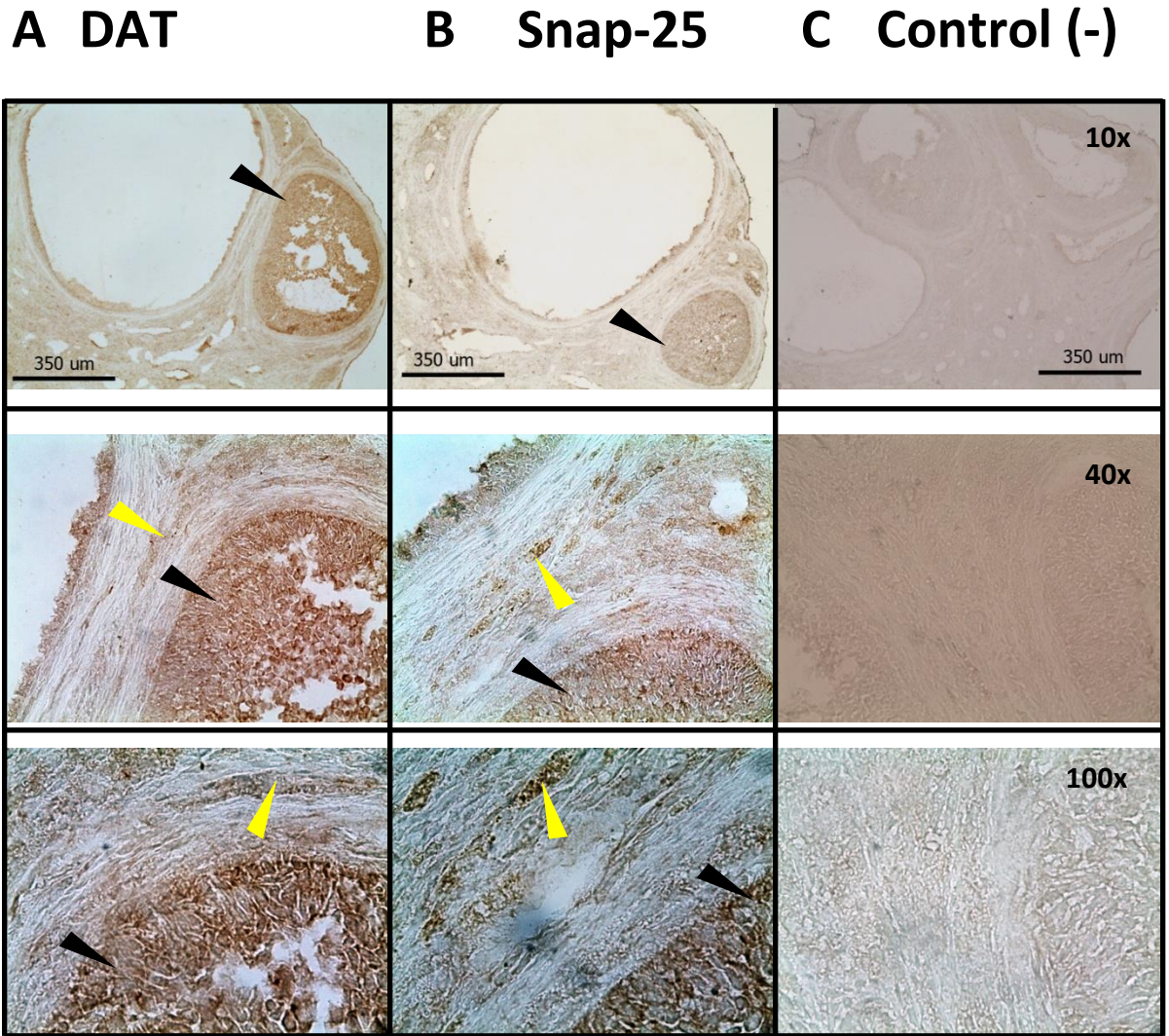


Figura 18. La figura muestra presencia de DAT (A) y Snap-25 (B) versus el control negativo (C) (solo Ab secundario). Ambos antígenos marcan la zona intersticial (flecha negra) y granulosa (flecha amarilla). Los cortes se muestran a distintos aumentos consecutivos de arriba hacia abajo, siendo el primero 10X, el segundo 40X y el tercero 100X.

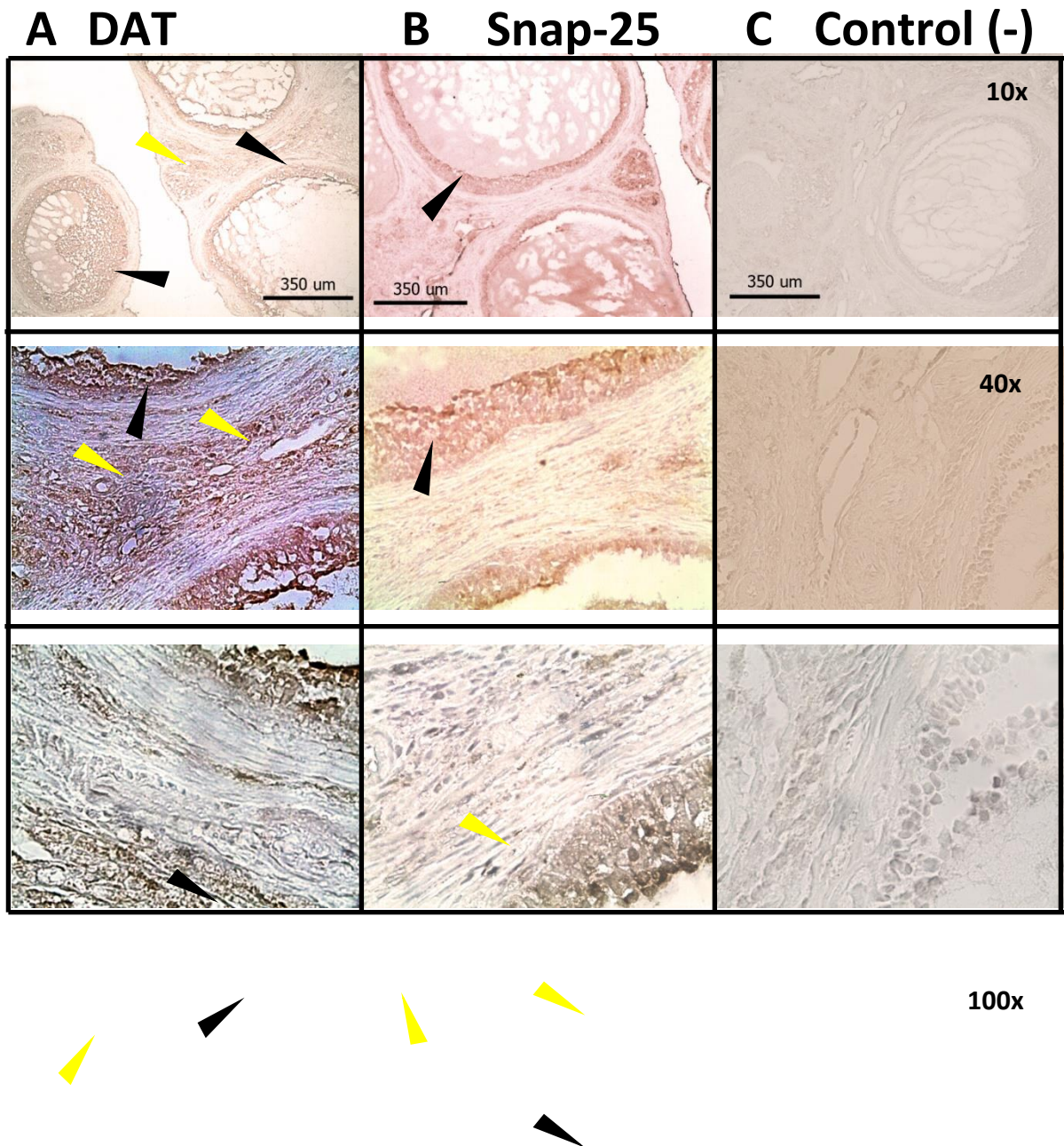


Figura 19. La figura muestra presencia de DAT (A) y Snap-25 (B) versus el control negativo(C) (solo anticuerpo secundario). Ambos antígenos marcan de manera considerable la zona intersticial (flecha amarilla), células de la granulosa (flecha negra) y cuerpos lúteos del ovario. Los cortes se muestran a distintos aumentos consecutivos de arriba hacia abajo, siendo el primero 10X, el segundo 40X y el tercero 100X.

4. Discusión

El primer objetivo del presente trabajo, fue el estudio de la capacidad de incorporar y posteriormente liberar $^3\text{H-NE}$ inducido por un estímulo iónico (BKK+), en diferentes compartimentos ováricos, siendo éstos (a) el ovario completo que representa la inervación extrínseca e intrínseca del ovario, (b) una solución enriquecida en células foliculares obtenidas por pinchazos sucesivos al ovario y (c) el ovario residual a la obtención de las células, el cual representa la inervación existente en el tejido intersticial, la que puede ser de origen extrínseco e intrínseco. Estas pruebas se realizaron en ratas de 6, 8, 10 y 12 meses de vida, separadas en grupos de controles y denervadas.

Nuestro primer estudio de liberación de $^3\text{H-NE}$ con BKK+ logró corroborar antecedentes, donde se demostró que ovarios completos de ratas controles aumentan su capacidad de liberar $^3\text{H-NE}$ incorporada con la edad al someterlos a un estímulo eléctrico (6). Sin embargo, nuestras pruebas tuvieron algunas diferencias con respecto a esos resultados. De manera contraria a lo visto por medio de estimulación eléctrica, mediante estimulación con BKK+ no se logró una significativa detección en la liberación de $^3\text{H-NE}$ para ovarios completos en ratas de 6 meses de vida. Una explicación a esto, es la incapacidad del método para detectar mínimas cantidades de $^3\text{H-NE}$ liberada (21), lo cual probablemente se deba a que a los 6 meses de vida la inervación extrínseca al ovario es reducida, y la intrínseca sólo es detectable en células foliculares. Así para corroborar que el método era incapaz de detectar liberación de $^3\text{H-NE}$, se mejoraron las condiciones de exposición del ovario tanto a $^3\text{H-NE}$ como a BKK+, realizando experimentos de liberación en ovarios residuales de ratas controles, donde la exposición de los terminales nerviosos es máxima (se tiene una mayor superficie expuesta, tanto de la cara externa como interna del ovario) no logrando detectar liberación de NE exógena a los 6 meses de vida.

Otra diferencia entre los experimentos de liberación con estímulo eléctrico, versus los realizados con estímulo iónico es la expresión de resultados, ya que por lo general en el primero, los resultados se expresan como % de liberación fraccionada, sin embargo, en nuestros experimentos los resultados fueron expresados como cpm de $^3\text{H-NE}$ liberadas. La razón de nuestra elección, es el comportamiento en la liberación de los basales,

entendiéndose por ésta, como la capacidad de los tejidos y células de liberar $^3\text{H-NE}$ incorporada de manera espontánea y sin un estímulo excitatorio. Así, cuando se realizó la interpretación de nuestros resultados como porcentaje de liberación fraccionada (datos no mostrados) obtuvimos que la liberación basal con la edad disminuye progresivamente desde un 7% a los 6 meses, hasta un 1% a los 12 meses. Este hecho no implicaba una alteración en el perfil de liberación con la edad, pero sí dificultaba la clara interpretación y exposición de los resultados. Por esta razón, nuestros experimentos fueron expresados como cpm. de $^3\text{H-NE}$ liberadas, unidad de medida cuya magnitud numérica permite observar basales similares para todas las edades, permitiendo comparar los distintos grupos experimentales. Ahora bien, algunos trabajos previos, han señalado que la diferencia en la cinética de basales utilizando el método de estimulación con K^+ 80 mM se deben a diferencias en la concentración de Na^+ , la cual se varía para mantener la osmolaridad del Buffer Krebs. Esta variación lleva al Na^+ de 130 mM en el Buffer Krebs normal (utilizado para los basales) a 50 mM en el Buffer Krebs K^+ 80mM (utilizado para estimular), provocando una inversión en los transportadores de catecolaminas y generando así la salida espontanea de $^3\text{H-NE}$ desde el citoplasma hacia el exterior (25). Sin embargo, para nuestro caso, esta explicación es insatisfactoria por dos motivos: el primero, es que de ser cierta, los basales a todas las edades serían similares, y no como en nuestro caso donde los basales disminuyen con la edad. El segundo motivo, es que el cambio en la concentración de Na^+ se suscita sólo cuando se aplica el estímulo, y no en forma previa. Por lo tanto, el hecho de observar que con la edad disminuye la liberación espontanea sin haber aplicado previamente un estímulo, indica que la diferencia entre los basales se debe a un cambio en el comportamiento de los tejidos y no a un artificio del buffer utilizado.

Una explicación que se ajusta de mejor manera a nuestras condiciones experimentales, es la especialización-tipo nerviosa de los tejidos ovárico a medida que la rata envejece, permitiendo así un mejor control en la liberación de catecolaminas desde el terminal nervioso. Esta hipótesis se basa en el hecho de que durante la formación del sistema nervioso central, primero se forma la maquinaria necesaria para la incorporación de catecolaminas en el terminal nervioso y posteriormente la maquinaria necesaria para la liberación de ésta (26). Nuestros experimentos avalan lo anterior, ya que al medir la

incorporación de $^3\text{H-NE}$ en ovarios completos a todas las edades tratadas, se evidencia que los tejidos no cambian significativamente con la edad su capacidad de incorporar catecolaminas exógenas (6). Sin embargo, varían considerablemente su capacidad de liberarla frente a un estímulo, ya sea de origen eléctrico o iónico.

Esta posibilidad no descarta lo que ocurre en la liberación mediante estímulo eléctrico, donde los basales a todas las edades son similares. La razón es que el estímulo eléctrico no sólo depolariza membranas de células con actividad tipo neuronal, sino también aquellas que no cumplen con esta característica, lo que provoca que todas aquellas células que hayan incorporado $^3\text{H-NE}$, posteriormente la liberen a través de sistemas no necesariamente vesiculares, generando así liberación basal similar en todas las edades tratadas. Finalmente, la principal evidencia que sustenta esto, es el hecho de que existen transportadores de catecolaminas de baja afinidad que se encuentran distribuidos en casi todos los tejidos y que permiten la incorporación de $^3\text{H-NE}$ en células no neuronales (27). Lo interesante de estos transportadores es que no son sensibles a los inhibidores clásicos como la cocaína, respaldando nuestros experimentos de bloqueo con éste fármaco, donde para todos los tejidos tratados vimos una disminución significativa pero no un bloqueo total en la incorporación de $^3\text{H-NE}$.

Luego de haber corroborado que los experimentos de liberación de $^3\text{H-NE}$ en estanco permiten observar un aumento con la edad de la liberación en ovarios completos, el siguiente paso fue realizar esta evaluación en ovarios denervados, los cuales carecen de inervación extrínseca que llega a través del nervio ovárico superior. Los resultados revelaron en primera instancia una disminución significativa en la incorporación de $^3\text{H-NE}$ entre los 6 y 10 meses (80% de disminución) y sólo un 30% de disminución a los 12 meses, edad a la cual se observa el menor impacto sobre la liberación de $^3\text{H-NE}$ incorporada por efecto de la denervación.

De la misma manera, se observó una disminución en la liberación espontánea y en la obtenida bajo estímulo, siendo esto consecuente a la ausencia de inervación simpática extrínseca. Este experimento logró demostrar que al final del periodo reproductivo de la rata existe un aumento tanto en la incorporación como en la liberación de $^3\text{H-NE}$ en forma

independiente de la innervación extrínseca, avalando la hipótesis de que existen grupos celulares propios del ovario con características tipo-neuronales, permitiendo avanzar hacia la localización intraovárica de estos.

Basados en antecedentes de nuestro laboratorio, el primer foco de atención para la localización de las células responsables del aumento del tono adrenérgico intrínseco del ovario fueron las células granulosas, que habían demostrado en ratas pre-púberes la capacidad de incorporar catecolaminas a través de los transportadores NET y DAT, para posteriormente liberarla frente a un estímulo de K^+ 80 mM (22). La obtención de células de la granulosa para los experimentos en ratas adultas se realizó de la misma manera que para ratas pre-púberes, por lo que debió tenerse en consideración, que al pinchar el ovario de ratas senescentes y extraer las células, se obtendría un fluido ovárico enriquecido en células de la granulosa, pero del cual no podríamos descartar la presencia de células lúteas y tecales. Además, en ratas adultas, las CG no sólo provienen de folículos sanos, sino también de folículos antrales, atrésicos, tipo III y cuerpos lúteos (28). Tomando en cuenta lo anterior, los resultados de estos experimentos, fueron sorprendentes y distintos a lo esperado, ya que el perfil de incorporación y liberación de 3H -NE no es consecuente con lo obtenido en ovarios completos. En primer lugar los resultados de incorporación de 3H -NE mostraron fluctuaciones similares en células provenientes de ratas Controles y SONX aunque en éstas últimas la incorporación fue menor. Así, entre los 6 y 8 meses de vida existe un aparente aumento en la incorporación de 3H -NE, el cual a los 10 meses decae bruscamente para finalmente reestablecerse los 12 meses. Luego, en los experimentos de liberación en células control, se observó el mismo comportamiento. Finalmente, al evaluar la liberación de 3H -NE en células de ratas SONX, comprobamos que éstas pierden toda capacidad de liberar NE exógena, incluso cuando ésta sí ha sido incorporada.

Una explicación a este inesperado perfil de incorporación y liberación de 3H -NE de las células ováricas, es que éstas responden de manera inversa al aumento sostenido en el tono adrenérgico total del ovario, ya sea este de origen extrínseco o intrínseco. Es decir, el aumento sostenido en el tono adrenérgico global en el ovario genera en las células una hipo-respuesta a la incorporación y liberación de 3H -NE, lo cual puede ser consecuencia de

(a) una *Downregulation* de los transportadores de catecolaminas y (b) un aumento en la mortalidad de estas células.

La primera opción es viable debido a que nuestros experimentos de bloqueo con cocaína en células de ratas de 10 meses, donde existe la menor incorporación de $^3\text{H-NE}$, no logran disminuir la incorporación, señalando la ausencia o insensibilidad de los transportadores. Sin embargo, y contraria a esta hipótesis, existen estudios donde se señala que el aumento de actividad nerviosa, implica una mayor actividad y presencia de transportadores NET y DAT y no una disminución de éstos (29).

La segunda opción se encuentra avalada por diversos estudios realizados en cardiomiocitos, donde una elevación en la concentración de NE genera apoptosis mediada por receptores β_1 -adrenérgicos (30). Este hecho se opone al aumento en la razón antiapoptótica de Bcl2/Bax, encontrada al final del periodo reproductivo donde aumenta el tono simpático en el ovario (6). Además, en el ovario la cantidad de receptores β_1 -adrenérgicos representa solo 1% con respecto a los receptores β_2 -adrenérgicos que se pueden encontrar. (31). Finalmente en el presente trabajo se realizó una estandarización del protocolo de obtención de células ováricas (Anexo 1), donde se muestra, que a los 3 y 13 meses de vida, la cantidad de células foliculares vivas obtenidas es muy similar.

Aunque no se ha podido dilucidar el mecanismo por el cual las células ováricas responden a una variación del tono adrenérgico total, sí se observa que lo hacen de manera inversa. Esto puede corroborarse al duodécimo mes, cuando la incorporación y liberación en ovario completo disminuye con respecto a los 10 meses y las células ováricas recuperan su capacidad de incorporar y liberar $^3\text{H-NE}$. Además la incorporación se realizaría a través de transportadores específicos NET y DAT como demostraron los estudios de sensibilidad al bloqueo por cocaína.

Finalmente, el hecho de que la denervación inhiba completamente la liberación y no así la incorporación de $^3\text{H-NE}$ en las células ováricas es un fenómeno que hasta el momento se desconoce y solo avala la existencia de una relación directa entre los sistemas adrenérgicos extrínsecos e intrínsecos del ovario.

Todas las evaluaciones de incorporación y liberación de $^3\text{H-NE}$ en células ovaricas, nos permitieron demostrar que no serían éstas las responsables del aumento en el tono adrenérgico intrínseco del ovario al final del periodo reproductivo. Por esta razón, nuestro foco de atención se situó en el tejido intersticial del ovario, el que demostró tener un perfil de incorporación y liberación de $^3\text{H-NE}$ similar al observado en ovarios completos, aunque estos experimentos diferían principalmente en la cantidad numérica de $^3\text{H-NE}$ incorporada y liberada. Así, los ovarios residuales incorporaron entre 2-4 veces más y liberaron cerca de 10 veces más $^3\text{H-NE}$ que los ovarios completos. Nuestra explicación al respecto tiene dos aristas, la primera es que en el ovario residual existe un aumento en la superficie expuesta tanto a $^3\text{H-NE}$ como a K^+ 80, lo que favorece tanto la incorporación como su liberación. La segunda arista tiene relación con la purificación del tejido, ya que el ovario residual, se encuentra libre de la mayor parte de las células foliculares, permitiendo la exposición casi exclusiva de los terminales nerviosos extrínsecos y grupos celulares con a propiedades tipo-nerviosas en el intersticio ovárico.

De esta manera, demostramos que ovarios residuales y completos provenientes de ratas controles aumentan su capacidad de incorporación y liberación de $^3\text{H-NE}$ con la edad, encontrándose que en ambos casos la incorporación de norepinefrina exógena se ve significativamente disminuida al realizar un bloqueo farmacológico con cocaína. Este hecho refuerza la idea de que la incorporación se realiza de manera casi exclusiva por medio de transportadores de catecolaminas específicos tal como lo haría un tejido tipo-nervioso, ya sea de humanos o roedores (32,33).

Posteriormente se evaluó la capacidad de incorporar y liberar $^3\text{H-NE}$ frente a un estímulo con K^+ 80 mM que tiene el ovario residual de ratas SONX, recordando que este tejido representa solo la actividad tipo-nerviosa existente en el tejido intersticial intrínseca al ovario, y no la procedente desde el nervio ovárico superior. Los resultados de estos experimentos fueron sorprendentes y corroboraron la hipótesis del presente trabajo, demostrando que la incorporación y posterior liberación de $^3\text{H-NE}$ existente al denervar ovarios completos se debía a la existencia de células con esta cualidad en el tejido intersticial del ovario. Así, y comparando los ovarios residuales controles versus los

denervados, vemos que estos últimos poseen una actividad residual equivalente 30% al final del periodo reproductivo, tal como observamos al comparar ovarios completos controles y denervados.

Además se evidenció que las células en el ovario residual de ratas denervadas tienen una incorporación creciente de $^3\text{H-NE}$, la cual a todas las edades es disminuida a cerca de 10.000 cpm al bloquear farmacológicamente con cocaína, indicando por un lado que el sistema experimental se encuentra libre de influencias externas y por otro que la incorporación se realiza efectivamente por medio de los transportadores tipo-nervioso DAT y NET.

Es menester destacar que al comienzo de este trabajo se mencionó la existencia de un segundo tipo de inervación principalmente parasimpática (y en menor grado simpática), la cual se proyecta desde el plexo ovárico y llega al ovario a través de la arteria ovárica. En este trabajo no se realizaron pruebas ni bloqueo alguno de este componente, por lo cual no se puede descartar, que un leve porcentaje del aumento del tono adrenérgico intrínseco del ovario durante la senescencia sea aportado por este componente generalmente asociado a vasculatura.

Por último, y con el objetivo de demostrar la presencia de células con características tipo-neurona en el ovario, se realizaron evaluaciones de inmunorreactividad contra los marcadores nerviosos DAT (evaluando la presencia del transportador) y Snap-25 (para evaluar acoplamiento vesicular con el plasmalema en las posibles células secretoras) en cortes de ovario de ratas de 6, 10 y 14 meses de vida.

Estudios previos, han demostrado que el marcador nervioso DAT en ratas pre-púberes (22) se encuentra localizado preferentemente en las células de la granulosa. Sin embargo, debido a la edad de las ratas, en éste trabajo no se observó la presencia de éste marcador en cuerpos lúteos ni folículos atrésicos (éstas estructuras no son visibles en animales pre-púberes). De esta manera, en el presente trabajo, y utilizando ratas adultas, pudimos localizar DAT en células de la granulosa, cuerpos lúteos, folículos antrales y tejido intersticial. Con respecto a la ubicación de este marcador, se observó que durante el período

óptimo de fertilidad (6 meses) se encuentra preferentemente en células granulosas, y que hacia el final del periodo reproductivo, se encuentra distribuido entre las células granulosas, lúteas y tejido intersticial, reforzando la idea de que en el cese de la función ovárica existe un activo componente intrínseco del ovario formado por una porción celular y otra intersticial.

Un interesante estudio que evaluó la presencia del marcador Snap-25 en ratas sprague-dawley en edad fértil (23), mostró que éste marcador se encuentra localizado tanto en células granulosas lúteas y en ovocitos. Además demostró *in vitro* que la expresión de esta proteína es modulada en forma directa por la presencia de FSH. Este último hecho avala nuestros resultados, debido a que durante la senescencia aumenta la concentración de FSH plasmática lo que posiblemente aumenta la expresión de Snap-25 en células intrínsecas del ovario. De esta manera, en el presente trabajo se observó que a los 6 meses Snap-25 se encuentra preferentemente localizado en células granulosas y lúteas, y que hacia el final del periodo reproductivo, se distribuye tanto en dichas estructuras, como en el tejido intersticial, lo que nuevamente refuerza la existencia de un sistema adrenérgico intrínseco del ovario que tendría un componente celular y uno intersticial.

Así, las evaluaciones inmunohistoquímicas que fueron de carácter cualitativo, permitieron determinar la presencia de ambos marcadores tanto en células de la granulosa y lúteas como en el tejido intersticial, observándose en este último agrupaciones celulares similares a ganglios. Sin embargo, estos estudios inmunohistoquímicos se realizaron solo en ovarios de ratas controles, y no en ratas denervadas, por lo que no se pudo distinguir si los marcadores nerviosos utilizados correspondían a terminales nerviosos extrínsecos o a células intrínsecas. De esta manera, las evaluaciones futuras deben contemplar el uso de ratas denervadas y marcadores nerviosos que consideren el cuerpo neuronal

En este trabajo se ha observado funcionalmente en el ovario, la existencia de células con la capacidad de incorporar y liberar $^3\text{H-NE}$ al final del periodo reproductivo, y que éstas utilizarían una maquinaria protéica similar a la del tejido nervioso para participar en la homeostasis intraovárica de NE. Este sistema adrenérgico intrínseco del ovario, tendría un componente celular y otro intersticial, aunque en este último no se ha demostrado la

presencia de neuronas en la cepa de ratas Sprague-Dawley (20). Este hecho no implica que no existan este tipo de células en el tejido intersticial de la cepa utilizada. Así, en otras especies, se evaluó la presencia de neuronas intrínsecas del ovario en ratas juveniles y senescentes (34), avalando que en éste organo existen neuronas que apoyarían la homeostasis de NE. De esta manera, existen estudios que demuestran que en ratas wistar, cerdos y monos, al final del periodo reproductivo poseen neuronas en el intersticio ovárico (34). Por otro lado, estudios realizados con cultivos de células intersticiales procedentes de ovario de pollo, en presencia de LH o hCG, han mostrado la diferenciación fenotípica de estas células hacia células con características tipo-nerviosas (35).

Estos antecedentes, apoyan la hipótesis de que al final del período reproductivo de las ratas Sprague Dawley, podrían existir en estructuras de origen folicular e intersticio ovárico, células no necesariamente neuronales, pero cuyas características funcionales les permitieran comportarse fisiológicamente como éstas.

5.a. Resumen general del trabajo

Los estudios en ovario de ratas que se encuentran en la etapa final del período reproductivo han demostrado que el ovario aumenta la liberación de norepinefrina, y la incorporación de este neurotransmisor se inhibe al bloquear con cocaína el transportador de catecolaminas (70-90%) en todas las edades estudiadas. Al desnervar el ovario disminuye drásticamente la capacidad de incorporar y liberar $^3\text{H-NE}$ del ovario. Sin embargo, bajo esta condición, a los 10 meses de vida existe una capacidad residual de incorporación y liberación de $^3\text{H-NE}$ equivalente al 30% del total, dando cuenta de la importancia del componente intrínseco en esta edad.

El componente intersticial del ovario, analizado al eliminar las células foliculares (ovario residual) aumenta significativamente la capacidad de incorporar y liberar $^3\text{H-NE}$ con la edad, obteniéndose un resultado de perfil similar pero de menor magnitud en ratas que han sido denervadas. Esto resalta la participación de ambos componentes: intrínseco y extrínseco después de los 10 meses de edad. Esta actividad nerviosa extrínseca e intrínseca es inhibida al bloquear los transportadores con cocaína (80-90%).

Los estudios en células ováricas aisladas muestra un aumento en la incorporación y liberación de $^3\text{H-NE}$ con la edad, excepto a los 10 meses, donde se tiene el efecto opuesto. Al denervar el ovario se inhibe también la incorporación y liberación de NE en las células ováricas, sin embargo a los 10 meses de edad no se observó cambios. La participación de ambos componentes nerviosos extrínseco e intrínseco fue confirmada al bloquear los transportadores con cocaína, excepto a los 10 meses de edad.

El análisis de la inmunoreactividad de DAT y SNAP-25 en ovario de rata de 6, 10 y 14 meses demostró que ambos se localizan en el tejido intersticial y en las células de la granulosa. Sin embargo, el análisis preliminar de la intensidad de la inmunoreactividad cambia con la edad, es débil a los 10 meses y es más intensa a los 14 meses comparada cualitativamente con los ovarios de 6 meses de edad.

5.b Conclusiones del trabajo

- La actividad del sistema nervioso simpático extrínseca que llega al ovario, aumenta progresivamente con la edad a medida que se acerca al cese de la función ovárica cerca de los 12 meses de edad.
- El ovario presenta un componente celular intrínseco con características tipo-neuronales que se encuentra activo hacia el final del periodo reproductivo (10-12 meses de edad) y que es capaz de incorporar catecolaminas a través de transportadores específicos para luego liberarlas frente a un estímulo depolarizante, dando cuenta de un tipo de células intraováricas que responden en forma similar a las células nerviosas. Este componente intrínseco, está compuesto por un componente celular de origen folicular y un componente celular ubicado en el intersticio ovárico.
- La fracción del ovario rica en células foliculares, presenta actividad tipo-nerviosa al incorporar y liberar catecolaminas, actividad que aumenta con la edad y que es inhibida al bloquear los transportadores de catecolaminas (excepto a los 10 meses). Sorprendentemente, esta actividad depende del componente nervioso extrínseco ya que al desnervar se pierde la actividad tipo neuronal en estas células.
- Estos resultados sugieren que el aumento de la actividad nerviosa del ovario observado al final del periodo reproductivo depende en una mayor proporción de un componente extrínseco y en menor proporción de un componente intrínseco y que entre ambos existe un relación complementaria para regular los procesos fisiológicos involucrados en la senescencia del ovario.

De esta manera, la implicancia biológica de los resultados y conclusiones obtenidos, dice relación con el entendimiento acerca del aumento del tono adrenérgico total en el ovario al final del periodo reproductivo de los mamíferos, permitiendo comprender de mejor manera los procesos involucrados en la senescencia ovárica. En este sentido, se generan nuevos antecedentes hacia la regulación nerviosa del ovario, permitiendo aventurar nuevas formas de modularla. Conocer los procesos que participan en la senescencia ovárica podría permitir abordar terapias a problemas de infertilidad y de alguna manera desacelerar el envejecimiento ovárico, o revertir patologías como el ovario poliquístico. En esta línea, se ha sugerido el uso de la denervación quirúrgica del nervio ovárico superior, la cual se ha visto revierte el fenotipo de ovario poliquístico y se reestablece la ovulación (18). Menos invasivas y de acuerdo a antecedentes preliminares de nuestro laboratorio, se podrían usar terapias farmacológicas destinadas al bloqueo de los receptores β -adrenérgicos del ovario utilizando propranolol. Este fármaco se utiliza en la regulación de la inervación adrenérgica en tratamientos cardiovasculares como la hipertensión, lo que señala un posible antecedente para la modulación nerviosa existente en el ovario.

7. Referencias

- 1_ Te Velde ER, Scheffer GJ, Dorland M, Broekmans FJ, Fauser BC; Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. *Mol Cell Endocrinol.* 145 (1-2): 67-73 (1998).
- 2_ Te Velde ER, Dorland M, Broekmans FJ. Age at menopause as a marker of reproductive ageing. *Maturitas.* *Mol Cell Endocrinol.* 30 (2):119-25 (1998).
- 3_ Te Velde ER, Pearson PL; The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update.* (2):141-54 (2002).
- 4_ Gambineri, A., C. Pelusi, V. Vicennati; Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* (26): 883–896 (2002).
- 5_ Pasquali R and Alessandra Gambineri Ann; Polycystic Ovary Syndrome A Multifaceted Disease from Adolescence to Adult Age. *N.Y. Acad. Sci.* (1092): 158–174 (2006).
- 6_ Acuña E, Fornes R, Fernandois D, Garrido M, Greiner M, Lara H.E and Paredes A; Increases in norepinephrine release and ovarian cyst formation during ageing in the rat; *Reprod Biol Endocrinol.*; 7:64 (2009).
- 7_ Genevieve Neal-Perry and Nanette F. Santoro; Aging in the Hypothalamic–Pituitary–Ovarian Axis; *Physiology Of Reproduction* 3ª edición, 2729-2755 (2006).
- 8_ Clark JT; Sexual function in altered physiological states: comparison of effects of hypertension, diabetes, hyperprolactinemia, and others to "normal" aging in male rats; *Neurosci Biobehav Rev* 19(2):279-302 (1995).
- 9_ T K Woodruff, and K E Mayo; Regulation of Inhibin Synthesis in the Rat Ovary; *Annu Rev Physiol* (52): 807-821 (1990).
- 10_ Greiner M, Paredes A, Araya V and Lara HE.; Role of Stress and Sympathetic Innervation in the Development of Polycystic Ovary Syndrome; *Endocrine* (28): 319–324 (2005).
- 11_ Lawrence Jr IE, Burden HW; The origin of the extrinsic adrenergic innervations to the rat ovary. *Anat Rec* (196): 51–59 (1980).
- 12_ Burden, H.W: Catecholamines as hormone regulators. Ben-Jonathan, N., Bahr, J. M., and Weiner, R; Raven Press: New York: 261–278 (1985).
- 13_ Lara HE, Ferruz JL, Luza S, Bustamante D.A, Borges Y, Ojeda SR; Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome; *Endocrinology* (6): 2690-5 (1993).

14_ Barria A, Leyton V, Ojeda SR, Lara HE; Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation; *Endocrinology* (6):2696-703 (1993).

15_ Lara He, Dissen Ga, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JI, Ojeda Sr; 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*. (3):1059-72. (2000)

16_ Dorfman M, Ramirez V, Stener-Victorin E. and Lara H.E.; Chronic-Intermittent Cold Stress in Rats Induces Selective Ovarian Insulin Resistance; *Biology Of Reproduction* 80, 264–271, (2009).

17_ López-Muñoz F, Alamo C; Historical evolution of the neurotransmission concept; *J Neural Transm.*(5): 515-33 (2009).

18_ Morales-Ledesma L, Linares R, Rosas G, Morán C, Chavira R, Cárdenas M. and Domínguez R; Unilateral sectioning of the superior ovarian nerve of rats with polycystic ovarian syndrome restores ovulation in the innervated ovary; *Reproductive Biology and Endocrinology*: 8:99 (2010).

19_ D'Albora H, Anesetti G, Lombide P. Dees L, And Ojeda S. Intrinsic Neurons in the Mammalian Ovary; *Microscopy Research And Technique* (59):484–489 (2002).

20_ D'Albora H, Lombide P and Ojeda S.R.; Intrinsic neurons in the rat ovary: an immunohistochemical study; *Cell Tissue Res* (300):47–56 (2000).

21_ Ricu M, Paredes A, Greiner M, Ojeda S.R, and Lara HE.; Functional Development of the Ovarian Noradrenergic Innervation; *Endocrinology* (149): 50–56 (2008)

22_ Greiner M, Paredes A, Rey-Ares V, Saller S, Mayerhofer A, and Lara H.E.; Catecholamine Uptake, Storage, and Regulated Release by Ovarian Granulosa Cells; *Endocrinology* (149): 4988–4996 (2008).

23_ Grosse J, Bulling A, C. Brucker, U. Berg., Amsterdam A., Mayerhofer A, and. Gratzl M; Synaptosome-Associated Protein of 25 Kilodaltons in Oocytes and Steroid-Producing Cells of Rat and Human Ovary: Molecular Analysis and Regulation by Gonadotropins; *Biology Of Reproduction* (63), 643–650 (2000).

24_ Greiner M; Sistema nervioso ovárico intrínseco y su activación durante la condición de ovario poliquístico; Tesis de doctorado en bioquímica, Universidad de Chile (2006).

- 25_Torok TL, Salamon Z, Nguyen TT, Magyar K ;Spontaneous [3H]noradrenaline release from the main pulmonary artery of the rabbit induced by sodium-pump inhibition. *Q J Exp Physiol* (69):841–865 (1984).
- 26_Ziv NE, Garner CC; Cellular and molecular mechanisms of presynaptic assembly; *Nat Rev Neurosci*.(5):385-99 (2004).
- 27_Eisenhofer G; The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines; *Pharmacology & Therapeutics* (91): 35-62 (2001).
- 28_Gougeon A; Dynamics of Human Follicular Growth: Morphologic, Dynamic, and Functional Aspects; *The ovary* (2^o Edition); Chapter 2, 25-43 (2004).
- 29_Ikeda T, Kurosawa M,Uchikawa C, Kitayama S, Nukina N ; Modulation of monoamine transporter expression and function by repetitive transcranial magnetic stimulation; *Biochemical and Biophysical Research Communications* (327); 218–224 (2005).
- 30_Singh K, Xiao L, Remondino A, Douglas B. And Colucc W.S; Adrenergic Regulation of Cardiac Myocyte Apoptosis; *Journal Of Cellular Physiology* (189):257-265 (2001).
- 31_Aguado L.I., Petrovic S. L and Ojeda S. R; Ovarian β -Adrenergic Receptors during the Onset of Puberty: Characterization, Distribution, and Coupling to Steroidogenic Responses; *Endocrinology* (122): (1982).
- 32_Dawn D Han and Howard H Gu; Comparison of the monoamine transporters from human and mouse in their sensitivities to psychostimulant drugs; *BMC Pharmacology* (2006).
- 33_Ravna A, Sylte I, Dahl A; Molecular mechanism of citalopram and cocaine interactions with neurotransmitter transporters; *J Pharmacol Exp Ther.* (307): 34-41 (2003).
- 34_Les Dees W, Hiney , McArthur J, Johnson G, Dissen G and Ojeda S; Origin and Ontogeny of Mammalian Ovarian Neurons; *Endocrinology* (147):3789–3796 (2006).
- 35_Avila R, Samar ME, Ferraris R, Centuri3n C; Subcellular aspects of interstitial cell innervation in chick embryo ovary cultured with LH or hCG; *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba.* (59):63-9 (2002).
- 36_Rosa-e-Silva A, Guimaraes M, Padmanabhan V. and Lara H.E; Prepubertal Administration of Estradiol Valerate Disrupts Cyclicity and Leads to Cystic Ovarian Morphology during Adult Life in the Rat: Role of Sympathetic Innervation; *Endocrinology* (10): 4289-4297 (2003).

Con el objetivo de validar los estudios de incorporación y liberación de $^3\text{H-NE}$ en células foliculares, se realizaron pruebas de viabilidad y lavados de radiactividad celular.

De esta manera, se comprobó que al quinto lavado, las células contienen una cantidad estacionaria de radiactividad (1800 ± 220 cpm), demostrando que el quinto lavado es el adecuado para considerar como basal o pre-estímulo (Gráfico A). Estas cantidades de radiactividad son las encontradas en el sobrenadante de los lavados, por lo cual no necesariamente hacen relación con la radiactividad incorporada a través de transportadores específicos de las células.

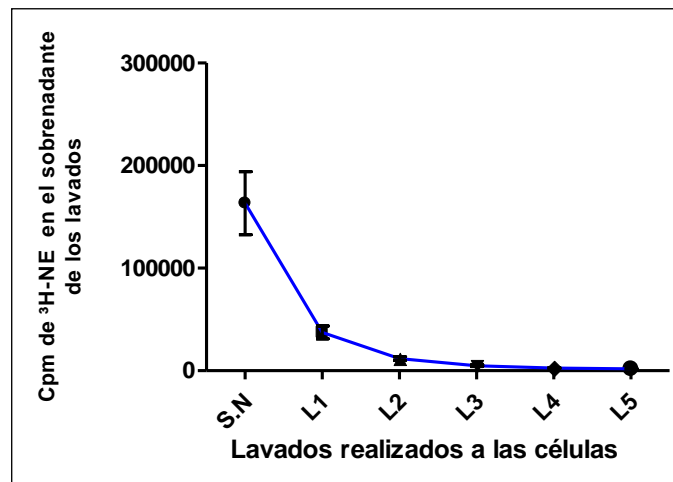


Gráfico A: El gráfico muestra la pérdida de radiactividad adsorbida por las células ováricas desde el Sobrenadante (S.N) hasta el lavado 5 (L1-L5). Se utilizaron ratas de 8, 10 y 12 meses de edad con un $n=4$ para cada edad.

Luego, para determinar la pérdida celular producto de los lavados, se midió la viabilidad y mortalidad contando el número de células desde la obtención de las células hasta la cuantificación de la radiactividad. Para esto se utilizó una cámara de Neubauer y el microscopio de luz Olympus CX-31. Las células fueron teñidas con azul de tripán al 10% en BK. Se utilizaron ratas de 3 y 13 meses.

Los resultados mostraron que en $150 \mu\text{L}$ de suspensión se obtienen cerca de 230.000 células foliculares vivas al pinchar el ovario y sin importar la edad (Gráfico B). El desglose de las células obtenidas, estima que al inicio se obtienen 200.000 vivas y 30.000 muertas. Los resultados también estiman que en el lavado 5 el número de células viables es cerca de 20.000, las cuales no varían hasta el término del experimento (Gráfico C). El número de células muertas varía entre en 10.000 y 20.000 dependiendo de la edad para el mismo lavado (Gráfico D).

Estos resultados indican, que a pesar de la mínima cantidad de células disponibles para los experimentos de incorporación y liberación de $^3\text{H-NE}$, las células existentes permiten la realización adecuada de éstos experimentos, ya que no varía considerablemente el número de células luego del lavado 5.

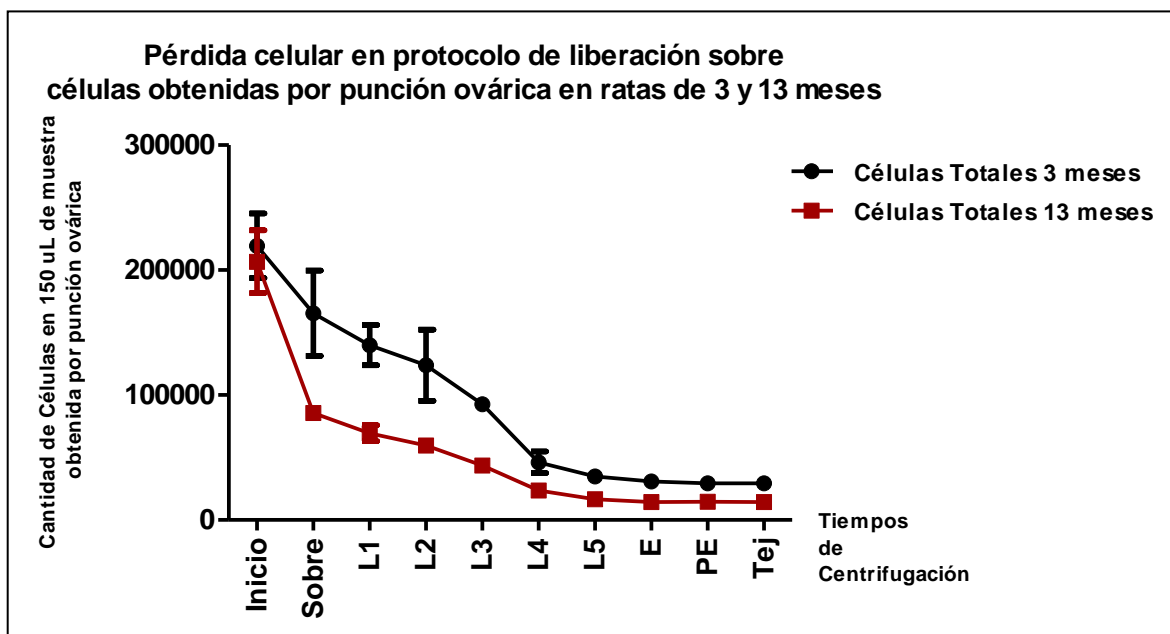


Gráfico B: El gráfico muestra la pérdida celular por efecto de los lavados (centrifugaciones y resuspenciones) desde la obtención de las células (Inicio) hasta la cuantificación de radiactividad de los tejidos (Tej.). Se utilizaron dos ratas de 3 meses y dos de 13 meses de vida. Resultados expresados como N° de Células \pm E.E

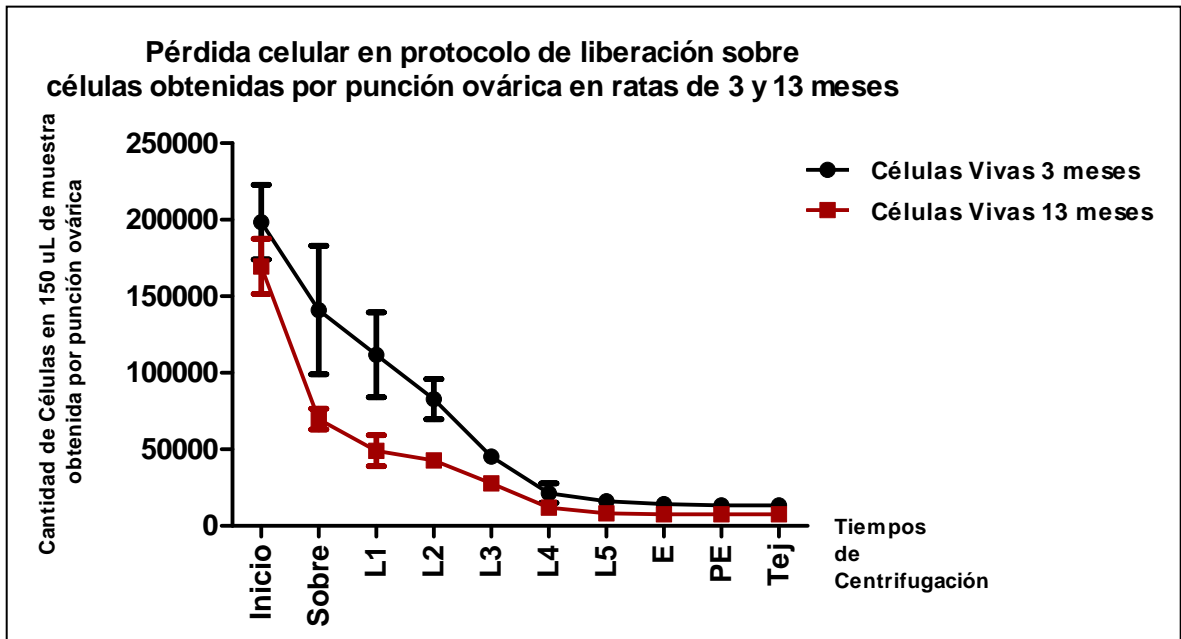


Gráfico B: La figura muestra la pérdida de células vivas producto de los lavados desde la obtención de las células hasta la cuantificación de la radiactividad. Se observa que entre el lavado 5 y el término del experimento, la cantidad de células no varía considerablemente a ninguna de las dos edades tratadas. Se utilizaron dos ratas de 3 meses y dos de 13 meses de vida. Resultados expresados como N° de Células \pm E.E

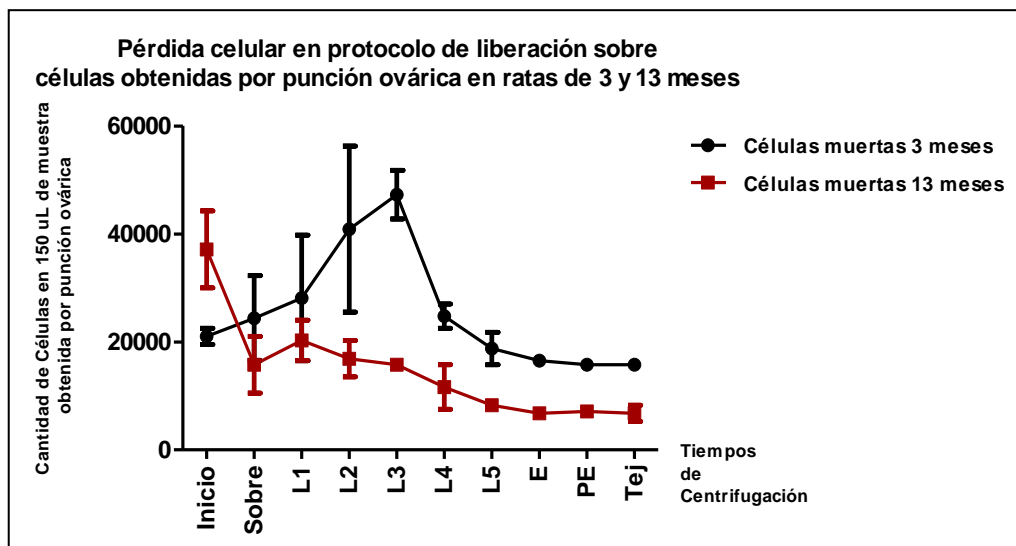


Gráfico C: La figura muestra el número de células muertas en los lavados desde la obtención de las células hasta la cuantificación de la radiactividad. Se utilizaron dos ratas de 3 meses y dos de 13 meses de vida. Resultados expresados como N° de Células \pm E.E