

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

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



**ESTIMULACIÓN ADRENÉRGICA EN RATAS DURANTE  
EL PERÍODO NEONATAL: *EFFECTOS SOBRE LA FUNCIÓN  
REPRODUCTIVA OVÁRICA DURANTE EL DESARROLLO  
Y LA ETAPA ADULTA***

**PROFESOR PATROCINANTE Y DIRECTOR DE MEMORIA:  
DR. HERNÁN ENRIQUE LARA PEÑALOZA**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

Memoria para optar al título de  
**BIOQUÍMICO**

**SERGIO GUILLERMO HERNÁNDEZ TAPIA**

Santiago de Chile  
2008

## Agradecimientos:

- A mi Familia: Mis Padres, Julia y Sergio, Mi Hermana Alejandra, Abuelos, Tíos, Tíos y Primos. Gracias por su apoyo, por su preocupación y por confiar en mí.
- A mi polola Daniela, gracias por apoyarme y darme ánimo en los momentos que más lo necesitaba. Sin tus consejos y críticas esta memoria no hubiera sido la misma. TE AMO.
- A mis compañeros y amigos, gracias por su amistad y por los buenos momentos que hemos pasado juntos. En especial a la gente de “Colina 2”: Gonzalo, Ariel, Eric, Claudio, Mauricio, Pablo, Ramón, Alfonso, Monika, Leticia y Gabriel, con los que compartí muchos momentos de alegría y buena comida.
- Al equipo de las Profesoras Carmen Romero y Margarita Vega por su aporte en las correcciones de este trabajo.
- Agradecimientos especiales al Profesor Hernán Lara, por aceptarme en su laboratorio y permitir realizar mi memoria bajo su dirección. Muchas gracias por su paciencia y buena disposición.
- A todos quienes colaboraron de una u otra forma, ¡Gracias!

# INDICE

<i>TABLA DE FIGURAS</i> .....	2
<i>Abreviaturas</i> .....	3
<i>Resumen</i> .....	5
<i>Abstract</i> .....	6
1. <i>INTRODUCCIÓN</i> .....	7
1.1. Hipótesis: .....	12
1.2. Objetivo principal: .....	12
1.3. Objetivos secundarios: .....	12
2. <i>MATERIALES Y MÉTODOS</i> .....	13
2.1. Animales .....	13
2.2. Tratamiento .....	13
2.3. Apertura Vaginal y ciclicidad estral .....	15
2.4. Homogenización de las muestras de ovario.....	15
2.5. Cuantificación de NGF ovárico. ....	15
2.6. Cuantificación de Noradrenalina ovárica.....	17
2.7. Homogenización de ganglio celiaco y cuantificación de NA.....	18
2.8. Cuantificación de catecolaminas adrenales. ....	18
2.9. Cuantificación de hormonas esteroidales.....	18
2.10. Determinación de los niveles de mRNA del FSHR mediante Real time PCR. ....	19
2.11. Análisis Estadístico.....	21
3. <i>RESULTADOS</i> .....	22
3.1. <i>ETAPA NEONATAL</i> .....	22
3.1.1. Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre la expresión del FSHR. ....	22
3.2. <i>ETAPA PERIPUBERAL</i> .....	23
3.2.1. Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre la pubertad y ciclicidad estral...23	
3.2.2. Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre el peso corporal. ....	27
3.3. <i>ETAPA ADULTA</i> .....	28
3.3.1. Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre los pesos de los corazones.....28	
3.3.2. Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre el peso de los ovarios. ....	29
3.3.3. Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre el contenido de CA adrenales...30	
3.3.4. Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre el contenido de NA en GC. ....	31
3.3.5. Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre el contenido de NGF ovárico. ...32	
3.3.6. Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre el contenido ovárico de NA. ....33	
4. <i>DISCUSION</i> .....	36
5. <i>CONCLUSIONES</i> . ....	41

# TABLA DE FIGURAS

Figura N° 1: Diagrama del desarrollo Folicular en la rata .....	8
Figura N° 2: Diagrama de los tratamientos.....	14
Figura N° 4: Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre el inicio de la pubertad. ....	23
Figura N° 5: Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre la ciclicidad estral.....	24
Figura N° 6: Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre el porcentaje de días de permanencia en cada etapa del ciclo estral.....	25
Figura N° 7: Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre la cantidad de ciclos estrales regulares.....	26
Figura N° 8 : Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre el porcentaje de ovulación.....	27
Figura N° 9: Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre el peso corporal. ....	27
Figura N° 10: Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre el peso del corazón. ....	28
Figura N° 11: Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre el peso relativo del ovario. ....	29
Figura N° 12: Efecto de la exposición neonatal con ISO sobre el contenido de las catecolaminas totales en la glándula adrenal. ....	30
Figura N° 13: Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre el contenido de NA en el GC.....	31
Figura N° 14: Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre el contenido de NGF ovárico.....	32
Figura N° 15: Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre el contenido de NA ovárica. ....	33
Figura N° 16: Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre los niveles séricos de hormonas esteroideas.....	34
Figura N° 17: Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre la función lutea. ....	35
Figura N° 18: Diagrama Resumen. ....	42

# Abreviaturas

$\Delta_4$  = Androstenediona.

CA = Catecolamina

cAMP = Adenosin monofostao cíclico.

Ct = Ciclo umbral

DPBS = Buffer fosfato salino de Dulbeco.

DTT = Ditrioteitol.

E<sub>2</sub> = Estradiol.

EIA = Inmunoensayo enzimático.

ELISA = Ensayo enzimático asociado a inmunosorbente.

EV = Valerato de estradiol.

FSH = Hormona folículo estimulante.

FSHR = Receptor de FSH.

GnRH. = Hormona liberadora de gonadotropinas.

HPLC = Cromatografía líquida de alta resolución

HSL = Lipasa sensible a hormona.

ISO = Isoproterenol.

LH = Hormona luteinizante.

mRNA = ARN mensajero.

NA = Noradrenalina.

NGF = Factor de crecimiento nervioso.

NPY = Neuropeptido Y.

OPN = Plexo nervioso ovárico.

P = Progesterona.

PCA = Ácido perclórico.

PCO = Ovario Poliquístico.

PCOS = Síndrome de Ovario poliquístico.

PCR = Reacción en cadena de la polimerasa.

PKA = Proteína quinasa A.

SON = Nervio ovárico superior.

TBST = Buffer de lavado.

VIP = Péptido vasoactivo intestinal.

## Resumen

El síndrome de ovario poliquístico (PCOS) es una patología neuroendocrina muy común en mujeres en edad fértil y está relacionada con más del 75% de los casos de infertilidad anovulatoria. Aunque la etiología del PCOS se desconoce, en este último tiempo se ha acumulado mucha evidencia que señala a los nervios simpáticos del ovario como un componente importante en la patología. De hecho, en el modelo de ovario poliquístico inducido por la administración de una dosis única de valerato de estradiol se observó una activación de los nervios simpáticos del ovario, reflejado en un aumento del contenido y en la liberación de noradrenalina (NA) de los terminales nerviosos. Se cree que el PCOS puede ser adquirido en etapas tempranas, como lo demuestran experimentos realizados en ratas en donde se les administró EV en el período neonatal y prepuberal. En ambos casos hubo una activación de la inervación simpática. Para probar la hipótesis de una activación temprana de los nervios simpáticos como factor etiológico, en el presente trabajo se administró isoproterenol (ISO), un agonista beta adrenérgico, en dosis crecientes de 125µg/kg peso (1X), 10X y 1000X, para remedar un tono adrenérgico aumentado a ratas neonatas y se vio cómo se afectaba la función reproductiva de este órgano cuando las ratas llegaron al estado adulto. Como resultado del tratamiento se adelantó el inicio de la pubertad en las ratas tratadas con la dosis 1000X de ISO. Aunque no regular, todos los grupos tratados presentaron ciclicidad estral y los niveles de esteroides plasmáticos no se vieron afectados en las ratas tratadas respecto al grupo control. Se observó una disminución en el contenido de NA en ovario en la dosis 1000X de ISO, mientras que el contenido de NGF ovárico aumentó en las dosis 1X y 1000X. Al parecer, la administración neonatal de ISO no produjo cambios permanentes en la foliculogénesis y esteroidogénesis, ya que es probable que la ventana en que se estimuló no fuera la adecuada para cambiar el desarrollo folicular. Sin embargo, se verificaron cambios importantes en las catecolaminas adrenales y en el tamaño del corazón por efecto del tratamiento. El adelantamiento del inicio de la pubertad nos indica que la estimulación adrenérgica podría modificar la sincronización del eje hipotálamo-hipófisis-ovario.

## **Abstract**

### **Adrenergic stimulation in rats during the neonatal period: effects on the ovarian reproductive function during development and adulthood**

The polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most frequent neuroendocrine disease in women during their reproductive years and corresponds to 75% of the anovulatory fertility cases. Although the etiology of PCOS remains unknown, a sizeable body of evidence points to the ovarian sympathetic innervation as a major component of the disease. Indeed, in the PCO model induced by the injection of a single dose of estradiol valerate, an activation of the ovarian sympathetic nerves has been demonstrated, as indicated by the increase in norepinephrine content and release from the nerve terminals. As it is suggested in epidemiologic studies in women and later confirmed in rats, it is believed that the PCOS can be developed in early stages of life. Neonatal and prepubertal rats injected with a single dose of estradiol valerate developed PCOS in the adult life. In both cases, an activation of the ovarian sympathetic nerves occurs. To test the hypothesis of an early activation of ovarian sympathetic nerves as an etiological factor of PCOS, in the present study we administered increasing doses of the beta-adrenergic agonist isoproterenol (ISO) in concentration of 125 µg/kg of body weight (ISO 1X), ISO 10X and ISO 1000X, to simulate an enhanced adrenergic tone in neonatal rats and to study the ovarian reproductive function when adults. The results show an early onset of puberty in the rats treated with the ISO 1000X dose. Although non-regular, all of the treated rats show estrous cyclicity and the plasma steroids levels did not change in the treated rats compared to the control group. The NE content in the ovary decreased in the ISO 1000X treated rats, while the NGF content in the ovary increase in the ISO 1X and in the ISO 1000X treated rats. It seems that the neonatal administration of ISO did not produce long term effects in the folliculogenesis and steroidogenesis. It is quite possible that the window in which the stimulation occurs was not the most indicated to change the follicular development. However, the adrenal and heart function was “programmed” by the neonatal ISO administration. In addition, the early onset of puberty indicates that the adrenergic stimulation could modify the synchronization of the hypothalamus-hipophysis-ovary axis.



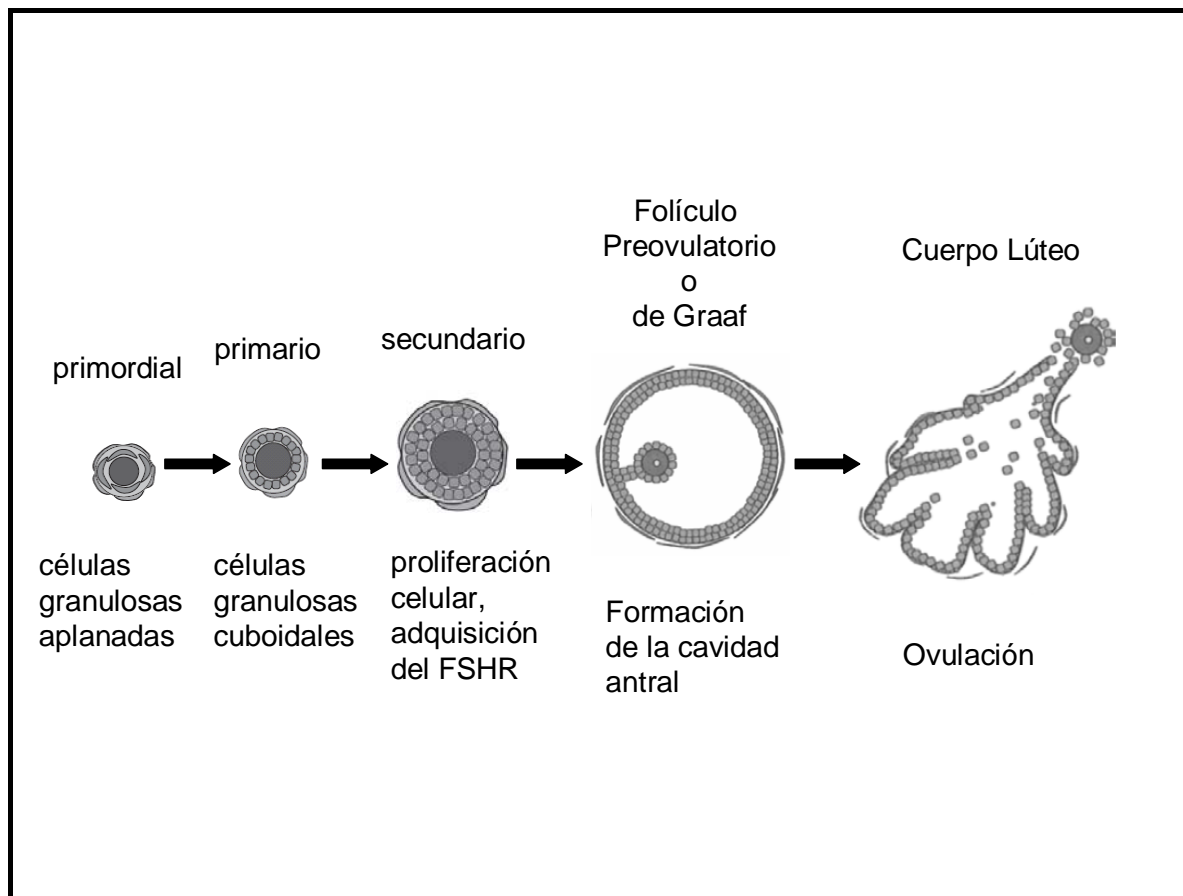
## **1. INTRODUCCIÓN.**

El ovario es el órgano encargado de liberar, durante cada ciclo menstrual, un ovocito completamente capacitado para ser fecundado (función gametogénica), y además participa en la preparación de los órganos reproductores para el desarrollo del embarazo, mediante la producción de hormonas esteroideas (función endocrina) (1).

En cuanto a la anatomía, el ovario consta de una zona externa, la corteza, y una zona interna, la médula. La corteza está cubierta de un mesotelio especializado llamado epitelio superficial, contiene una capa externa de tejido conectivo, la túnica albugínea, y una zona interna que contiene los folículos. Los folículos que no empiezan su desarrollo se ubican en una zona avascular. En cambio los folículos que maduran, los atrésicos y los cuerpos lúteos se ubican en el límite entre corteza y médula, que es una zona ampliamente vascularizada (2).

La unidad funcional del ovario es el folículo, el que está compuesto por células granulosas que rodean al ovocito, y más externamente por células de la teca, ambos tipos celulares (granulosa y teca) están separados por la membrana basal (1). Debido a la similitud del desarrollo folicular de la rata con el desarrollo folicular del humano, el primero ha sido usado ampliamente para estudios de desarrollo de la función reproductiva. Una de las diferencias entre ambas especies es que el desarrollo folicular en la rata se inicia en el período posnatal (3), mientras que en el humano se inicia en el período prenatal (4). En la rata el ensamblaje folicular, proceso en el que el ovocito se rodea de una capa de células granulosas de forma plana, ocurre en el primer día de vida, en este estado se le conoce al folículo como primordial (Figura N°1). En el siguiente estadio la monocapa de células granulosas adopta forma cuboidal y bajo estas características recibe el nombre de folículo primordial. Posteriormente, debido a la proliferación de las células granulosas, va aumentando el número de capas de granulosas que rodean al ovocito, cuando el

número de capas es dos o más, el folículo recibe el nombre de secundario (5). Aproximadamente, el día 8 el folículo pasa por un proceso de diferenciación que consiste en la adopción del receptor de FSH (6;7), lo que marca el inicio del control endocrino. La proliferación de las células del folículo sufre un receso cuando adopta una cavidad denominada antral. Posteriormente continúa la proliferación de sus células, formándose folículos antrales grandes o folículos de Graaf que ovulan en respuesta a un aumento en forma de pico en los niveles de hormona luteinizante (5).



**Figura N° 1:** Diagrama del desarrollo Folicular en la rata. Imagen modificada de (5).

La función ovárica es regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario de forma endocrina. El hipotálamo libera pulsos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), lo que regula la liberación por parte de la hipófisis de las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH). Estas gonadotropinas, por su parte, actúan sobre el ovario regulando el desarrollo folicular, esteroidogénesis y ovulación entre otros. Finalmente los esteroides secretados por el ovario regulan por retroalimentación la liberación de GnRH, a nivel del hipotálamo, y gonadotropinas a nivel hipofisiario (2).

Últimamente se ha descrito que el ovario presenta un componente regulador distinto al endocrino, se trata de un componente nervioso. El uso del trazado viral transneuronal (8) permitió confirmar la existencia de una vía nerviosa que nace en el hipotálamo, pasa por el ganglio celíaco y finalmente llega al ovario mediante el nervio ovárico superior (SON). Se sabe, además, que el ovario recibe inervación simpática y sensorial. La inervación simpática está representada por fibras catecolaminérgicas y que contienen neuropéptido Y (NPY) (9). La inervación sensorial consiste en nervios que contienen sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (10). Fibras que contienen el péptido vasoactivo intestinal son tanto simpáticas como sensoriales. Estas fibras nerviosas llegan al ovario por dos vías: el plexo nervioso ovárico (OPN) y el SON (11). Mientras que las fibras nerviosas del OPN se distribuyen alrededor de la vasculatura del ovario, el SON llega a los compartimentos secretores, es decir, a células intersticiales, a la teca y al cuerpo lúteo. La inervación simpática del ovario participa en la foliculogénesis (12) y en la esteroidogénesis (13). La regulación nerviosa del ovario quedó en evidencia en el trabajo de Aguado et al (13). La denervación del SON produjo una disminución en la secreción de esteroides aun en presencia de gonadotropinas. Otras investigaciones han demostrado que la activación simpática, específicamente la activación de los receptores  $\beta$

adrenérgicos del subtipo  $\beta_2$ , aumenta la secreción de esteroides en presencia de gonadotropinas (14).

Una de las patologías ováricas que afectan la función reproductiva de la mujer es el síndrome de ovario poliquístico (PCOS) (15). Esta enfermedad es responsable de un alto porcentaje de la infertilidad anovulatoria y además está asociada a hipertensión y diabetes mellitus tipo II. Los criterios para diagnosticar la enfermedad fueron establecidos en el congreso de Róterdam (16). Deben presentarse al menos dos de las tres manifestaciones que se mencionan a continuación: i) hiperandrogenismo bioquímico o clínico, ii) amenorrea y iii) presencia de quistes. La etiología de esta enfermedad es desconocida. Se cree que una de las causas de la enfermedad se debe a fallas en el control endocrino del ovario, sin embargo esto no es consistente con los niveles de las hormonas FSH y LH que se presentan durante la enfermedad (17).

El PCO es una enfermedad que no se da de forma espontánea en animales de laboratorio, como lo es la rata. Sin embargo, Brawer et al (18) diseñaron un modelo de PCO en ratas al inyectar una dosis única de 10mg/kg de valerato de estradiol (EV) por vía subcutánea. A los 60 días postinyección se observó presencia de quistes en el ovario. Luego Lara et al. (19) descubrieron que en este modelo se producía una activación simpática de los nervios que llegan al ovario. Esta activación se evidencia por una capacidad aumentada por parte de los terminales nerviosos de incorporar y liberar NA, un aumento en el contenido ovárico de NA y una disminución del número de receptores beta-adrenérgicos en los compartimentos del ovario que reciben inervación catecolaminérgica. Reforzando la idea de un componente nervioso en la etiología del PCO, se observó que la estimulación conjunta con un agonista beta-adrenérgico, ISO, y gonadotropina coriónica humana en ratas previamente inyectadas con EV presentan una secreción aumentada de esteroides (20). Esta hipersecreción se revierte si se desnerva el ovario a nivel del SON; además

se reduce el contenido de NA ovárica y, lo más importante, se restaura la ciclicidad estral y la capacidad ovulatoria (20).

Es probable que el PCOS tenga su origen en etapas tempranas del desarrollo debido a la exposición del neonato a sustancias exógenas que pueden alterar o programar la función del ovario de manera permanente. Respecto a la programación neonatal, recientemente Sotomayor et al (21), demostraron que la exposición neonatal a una dosis única de valerato de estradiol produce pubertad adelantada, y en la adultez, aciclicidad estral, presencia de quistes foliculares, disminución en el número de folículos sanos y aumento de los folículos atrésicos, todo esto acompañado de un aumento inicial de NGF y un incremento de la NA ovárica a los 2 meses de edad.

Para comprobar que la activación de los nervios simpáticos es un componente importante en el desarrollo de PCO, el siguiente paso sería activar directamente los nervios simpáticos para descartar un efecto directo del estradiol como factor etiológico. Dado que la maduración de los nervios, es decir, la edad en que se desarrolla la capacidad de almacenar y liberar neurotransmisores, se alcanza en el período peripuberal (22), el cambiar el patrón de descarga neuronal, específicamente adelantarlo, administrando un agonista beta adrenérgico en el período neonatal, se puede programar la función reproductiva ovárica. Mayerhofer et al (23) realizaron estudios *in vitro* en donde estimularon ovarios de ratas neonatas de 2 días de vida con ISO y péptido vasoactivo intestinal (VIP) observando que los ovarios expresaban el mRNA del receptor de FSH y P450 aromatasa al cabo de 8 horas de estimulación. Los ovarios luego de ser incubados con ISO durante 8 horas, fueron incubados con FSH durante otras 12 horas y se vio un aumento en la liberación de cAMP medido en el medio de cultivo. Además los ovarios de 2 días expuestos a VIP por 8 horas y posteriormente cultivados con FSH por otras 24 horas mostraron un mayor número de folículos con tres o más capas de células granulosas en comparación con los ovarios

que no fueron pretratados con VIP. Estos resultados abren la senda para entender lo que podría suceder en un modelo in vivo.

Frente a estos antecedentes se plantea la hipótesis:

### **1.1. Hipótesis:**

La activación de los receptores beta adrenérgicos del ovario mediante la administración de ISO, en el período neonatal produce trastornos de la función reproductiva del ovario que permanecen hasta la etapa adulta.

### **1.2. Objetivo principal:**

Observar y medir los cambios en la función reproductiva ovárica por efectos de la administración neonatal de ISO.

### **1.3. Objetivos secundarios:**

Período neonatal:

- Medir cambios en la expresión del receptor de FSH por efecto del tratamiento con ISO.

Período peripuberal:

- Observar cambios en el inicio de la pubertad y la ciclicidad estral.

Etapa adulta:

- Medir esteroides séricos: androstenediona ( $\Delta_4$ ), estradiol ( $E_2$ ) y Progesterona (P)
- Medir el contenido de catecolaminas totales en la médula adrenal y NA en el ganglio celíaco.
- Medir contenido de NA y NGF en el ovario.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Animales**

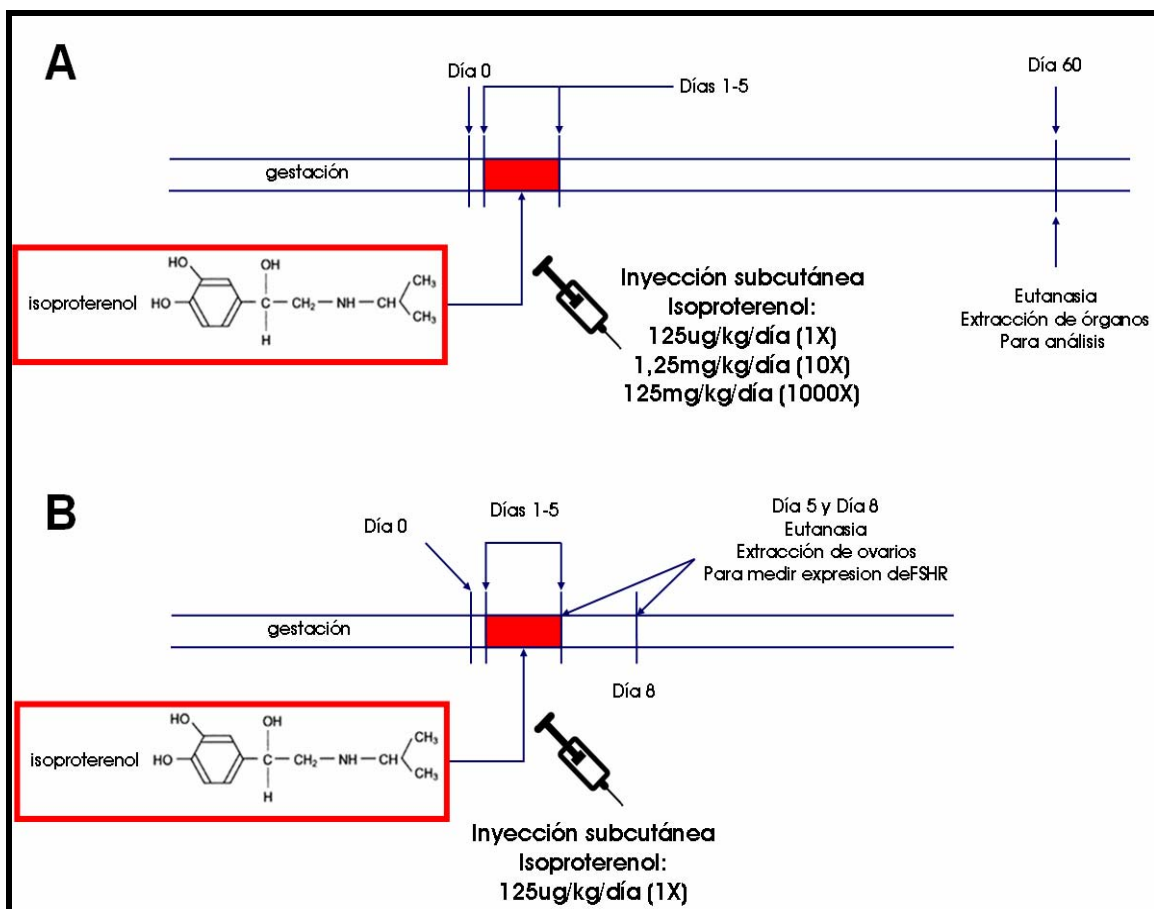
Se utilizaron ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley neonatas del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Se consideró el día de nacimiento como el día 0 de vida, el día de nacimiento de las ratas. El destete de los animales se produjo el día 21 de vida; posterior a éste día, a las ratas se les dio acceso libre a pellet y agua.

Durante todo momento, los animales fueron mantenidos con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas y a una temperatura de 20°C.

### **2.2. Tratamiento**

El tratamiento consistió en una inyección subcutánea de ISO, un agonista  $\beta$  adrenérgico, en dosis capaces de producir hipertrofia cardiaca (24), lo que permitirá confirmar la efectividad del tratamiento. El fármaco se diluyó en una solución fisiológica que contenía ácido ascórbico al 0,1% para evitar su degradación. La administración de este fármaco tuvo por objeto remedar una activación de los nervios simpáticos. Los animales se separaron en dos grandes grupos experimentales. En el primer grupo, con el fin de estudiar cambios en la expresión génica del receptor de FSH (FSHR), se inyectó ISO en una dosis diaria de 125 $\mu$ g/kg de peso durante los primeros 5 días de vida. Los animales se sacrificaron a distintos tiempos, al cumplir 5 días de vida y al cumplir 8 días de vida. Diseñamos este protocolo ya que, según lo descrito en la bibliografía, el FSHR se expresa en las células de la granulosa a los 8 días de vida en la rata. Dado que estudios de incubación en ovarios de 2 días por 8 hrs. producen un aumento en la expresión del FSHR (23), esperábamos ver un adelantamiento en la expresión del receptor por efecto del tratamiento, y nos pareció probable encontrar desde el 5° día de vida de animal la

expresión del receptor. En el segundo grupo de animales se estudió los efectos del tratamiento en la etapa adulta, para ello se realizaron 3 tratamientos con concentraciones crecientes de ISO: i) se inyectó ISO en una dosis diaria de 125 µg/kg de peso (1X) durante los primeros 5 días de vida. ii) se inyectó ISO en una dosis diaria de 1,25mg/kg de peso (10X) durante los primeros 5 días de vida, y iii) se inyectó una megadosis única de ISO de 125mg/kg de peso (1000X) el primer día de vida (Figura N°2). En todos estos grupos experimentales se esperó que los animales cumplieran 2 meses de vida, momento en que se sacrificaron y se colectaron los tejidos para los ensayos pertinentes. Los animales controles fueron inyectados de la misma forma con ácido ascórbico al 0,1% en suero fisiológico y sacrificados a los mismos tiempos que los animales tratados.



**Figura N° 2:** Diagrama de los tratamientos. En A se muestra el tratamiento para ver los efectos de la estimulación adrenérgica neonatal cuando adultas y en B se muestra el tratamiento para estudiar los efectos de la estimulación adrenérgica neonatal sobre la expresión del FSHR.



### **2.3. Apertura Vaginal y ciclicidad estral**

Durante el desarrollo se realizó un control diario del peso corporal, y se controló el ciclo estral a partir del día en que se produjo la apertura vaginal, la que ocurrió cerca del día 30 de edad. El ciclo estral se controló mediante frotis vaginales. Cada etapa del ciclo estral se caracterizó por la presencia de distintos tipos celulares, tales como células epiteliales, escamosas y leucocitos.

### **2.4. Homogenización de las muestras de ovario.**

La mitad de un ovario fue homogenizado manualmente en un homogenizador vidrio-vidrio, en 4 volúmenes de DPBS por peso de ovario, es decir 4  $\mu$ l de DPBS por cada miligramo de ovario (DPBS contiene KCl 2,68 mM, NaCl 136,89 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,47 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,1 mM,  $\text{CaCl}_2$  0,9 mM,  $\text{MgCl}_2$  0,49 mM).  $\frac{1}{4}$  del homogenizado se utilizó para la cuantificación de NGF y las  $\frac{3}{4}$  partes restantes se destinaron a la cuantificación de NA. El homogenizado destinado a la cuantificación de NGF se diluyó en una razón 1:10 con DPBS, se centrifugó a 10.000 rpm a 4°C durante 15 minutos, se colectó el sobrenadante y se conservó a -80°C hasta el día del ensayo. Por otro lado, el homogenizado en el que se cuantificó la NA ovárica se diluyó con  $\text{HClO}_4$  0,25N en una razón 1:5 para precipitar las proteínas. Luego se centrifugó a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C, se colectó el sobrenadante el cual fue conservado a -80°C hasta el día del ensayo para evitar la oxidación de la NA.

### **2.5. Cuantificación de NGF ovárico.**

Se realizó un inmunoensayo enzimático (EIA) para cuantificar NGF en la fracción soluble del homogenizado de ovario de rata. Se utilizó el Kit NGF  $E_{\text{max}}$  de Promega, que es un sistema que detecta NGF mediante una reacción inmunológica de tipo sandwich. Los pocillos de la placa son cubiertos con un anticuerpo policlonal contra NGF, posteriormente se le une un anticuerpo

monoclonal contra NGF (por esta razón se le denomina sandwich), este último anticuerpo es reconocido en su fracción constante por un conjugado que contiene una enzima que cataliza una reacción colorimétrica. La cantidad de NGF es por lo tanto proporcional a la intensidad de color. El método es bastante sensible, puede detectar hasta un mínimo de 7,8 pg/ml de NGF, y en cuanto a su especificidad, ocurre menos de un 3% de reacciones cruzadas con otros factores neurotróficos a una concentración de 10 ng/ml.

El protocolo es el que sigue:

- i. Se preparó el anticuerpo policlonal (Anti-NGF pAb) que va a cubrir los pocillos de la placa, diluyéndolo mil veces en buffer carbonato (25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 25 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9,7). Se agregó 100 µl a cada pocillo y se incubó la placa durante toda la noche 4°C. Al día siguiente se lavó una vez con buffer de lavado (TBST) (20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween<sup>®</sup> 20).
- ii. Se agregó 200 µl de buffer Block & Sample 1X para bloquear la unión no específica. Se incubó por 1 hora a temperatura ambiente sin agitación. Cumplido el lapso de 1 hora se lavó una vez con TBST
- iii. Se preparó una curva estándar de NGF realizando 6 diluciones seriadas 1:2 a partir de una concentración de 250 pg/ml de NGF (se diluyó con buffer Block & Sample 1X), también se preparó un blanco que contenía solo Block & Sample 1X. Puesto que el ovario tiene un alto contenido de NGF, las muestras también fueron diluidas para que cayeran dentro del rango de la curva (1:8000, 1:16000 y 1:32000). Cada pocillo contenía 100 µl de estándar o muestra. Se incubó la placa durante 6 horas a temperatura ambiente y con agitación (500 rpm). Cumplido el tiempo se lavó 5 veces con TBST.

- iv. A continuación se preparó el segundo anticuerpo (Anti-NGF mAb) diluyendo 2,5 µl de anticuerpo en 10 ml de buffer Block & Sample 1X. Se agregó 100 µl a cada pocillo y se incubó durante toda la noche sin agitar a 4°C. Al día siguiente se lavó con TBST 5 veces.
- v. Se preparó el conjugado Anti-IgG de rata, HRP diluyendo 100 µl en 9,9 ml de buffer Block & Sample 1X. se agregó 100µl por pocillo y se incubo con agitación por 2,5 horas a temperatura ambiente. Terminado el plazo se lavo con TBST 5 veces.
- vi. Se agregó 100 µl de solución TMB One a cada pocillo. Se incubó con agitación por un tiempo de 10 minutos a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción adicionando 100µl de HCl 1N y se midió la absorbancia en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 450 nm. La medición debe ser realizada no más allá de 30 minutos una vez detenida la reacción.

## **2.6. Cuantificación de Noradrenalina ovárica.**

Se cuantificó el contenido de NA en el sobrenadante del homogenizado de ovario obtenido según lo descrito previamente. La cuantificación se realizó mediante la técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) acoplada a un detector electroquímico. Una alícuota de 50 µl de sobrenadante fue mezclada con 50 µl de ácido perclórico (PCA) 0,2 N y fueron filtrados con un filtro desechable con poros de 0,2 µm de diametro. 20 µl del filtrado fueron inyectados al sistema de HPLC Waters equipado con una columna de fase reversa C18 y un detector electroquímico Waters 464. La fase móvil contenía 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,42 mM de octil-sulfato, 0,02% EDTA y 1% acetonitrilo, pH 2,5. La velocidad del flujo fue de 1ml/minuto. El potencial del detector amperométrico se fijó en 0,7 V. Bajo estas condiciones el tiempo de retención para la NA fue de 7,5 minutos.

### **2.7. Homogenización de ganglio celíaco y cuantificación de NA.**

El ganglio celíaco fue homogenizado en 1 ml de PCA 0,2 N en un homogenizador vidrio-vidrio con motor a máxima velocidad, luego se centrifugo el homogenizado a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue filtrado con un filtro desechable con poros de 0,2 µm de diámetro. 20 µl de dicho filtrado fueron diluidos con 4 volúmenes PCA 0,2 N. Finalmente 20 µl de este filtrado diluido fueron inyectados al sistema de HPLC Waters bajo las condiciones mencionadas anteriormente.

### **2.8. Cuantificación de catecolaminas adrenales.**

Las catecolaminas adrenales fueron cuantificadas por el método de Von Euler y Hamberg, el que se basa en la oxidación de adrenalina y NA a adrenocromo y noradrenocromo, las que absorben luz de 540 nm de longitud de onda. Las dos glándulas adrenales fueron pesadas y homogenizadas en 1 ml de PCA 0,2N con un homogenizador vidrio-vidrio (esta operación se realiza en hielo para evitar la degradación de catecolaminas). Luego se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se colectó el sobrenadante y se diluyó en H<sub>2</sub>O hasta completar un volumen de 4 ml. Se agregó una solución de I<sub>2</sub>/I<sup>-</sup> (que oxida las catecolaminas) en tampón acetato 1 M, y luego se detuvo la reacción con Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0,05 N. Finalmente se midió la absorbancia a 540nm.

### **2.9. Cuantificación de hormonas esteroidales.**

Luego de que las ratas fueran eutanasiadas por decapitación, se colectó la sangre troncal. Se separó el suero de aquella sangre para cuantificar las hormonas esteroidales (androstenediona, estradiol y progesterona) por inmunoensayo enzimático. Se utilizó un kit comercial para la medición, siguiendo las indicaciones del fabricante (ALPCO diagnostics). El ensayo consiste en un EIA de competencia. El antígeno presente en las muestras y estándares compite con el

antígeno unido a la enzima (conjugado) por los sitios de unión del anticuerpo presente en los pocillos. Luego de una serie de lavados, para remover especies unidas de manera no específica, se agrega sustrato a la enzima para que se produzca color. La absorbancia en este caso es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno presente. Brevemente describiré solamente el protocolo para medir androstenediona ya que los protocolos para medir los otros dos esteroides son muy similares:

- se agrega 25  $\mu$ l de Standard o muestra a los pocillos recubiertos con anticuerpo policlonal de conejo anti-androstenediona.
- Se agrega 100  $\mu$ l de conjugado, que es androstenediona unida a peroxidasa de rábano, a cada pocillo.
- Se incuba por 1 hora a temperatura ambiente en un agitador de placas a aproximadamente 200 rpm.
- Se lavan 3 veces los pocillos con solución de lavado y luego se secan golpeándolos bruscamente sobre papel absorbente para asegurarse que estén secos. El lavado generalmente es la etapa clave de este procedimiento.
- Se agrega 150  $\mu$ l de sustrato en cada pocillo y se incuba entre 10 y 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se agregan 50  $\mu$ l de ácido sulfúrico 1 M para detener la reacción y se leen las placas en un lector de placas de ELISA a 450 nm.

### **2.10. Determinación de los niveles de mRNA del FSHR mediante Real time PCR.**

Los mensajeros que codifican para el receptor de FSH fueron cuantificados por Real time PCR en ovarios de ratas neonatas. Se extrajo RNA total según el método de Chomczynski y Sacchi (25). 5 $\mu$ g del RNA total se transcribieron de forma reversa a 42°C usando una mezcla que contenía

1,6mM dNTP, 10mM DTT, 176nM random primers, 40U de RNase OUT, first strand Buffer 1X y 200U de Super Script™ II en un volumen total de 20µl. la transcripción se detuvo calentando a 75°C por 10 minutos. Para cuantificar el mRNA del FSHR se preparó un mix de PCR que contenía 12,5µl de 2X Brilliant platinum SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagen), 0,25µl de cada partidor, 10µl de H<sub>2</sub>O nanopura y 2µl de cDNA. El protocolo de amplificación fue el que sigue: Activación de la polimerasa a 95°C por 10 minutos, ciclos de amplificación y cuantificación a 60°C por 15 segundos y 72°C por 20 segundos respectivamente. La fluorescencia, que refleja la cantidad de producto formado, fue medida al final de cada paso de elongación, después de realizar una curva de desnaturalización para determinar los puntos de desnaturalización de los productos formados. Luego se calculó la cantidad de mensajero determinando los ciclos umbrales (Ct), es decir, el ciclo en que la formación de producto se torna lineal dentro de la fase exponencial, o el ciclo en que la fluorescencia emitida alcanza un valor umbral, que equivale a 10 veces la desviación estándar de la línea base. Los Ct obtenidos se compararon con los Ct de una curva estándar, diseñada con diluciones seriadas del mRNA de un tejido control cuya concentración era conocida.

Los partidores usados para amplificar el mRNA correspondiente al FSHR de rata fueron publicados por Romero et al (26): forward 5'-CAT-CAC-TGT-GTC-CAA-GGC-CA-3', correspondiente a los nucleótidos 1800-1819 del mRNA del FSHR de rata, y reverse 5'-TGC-GGA-AGT-TCT-TGG-TGA-AAA-3', correspondiente a los nucleótidos 1880-1900 del mRNA del FSHR de rata. Para normalizar las cantidades de mensajero del FSHR se midió el mRNA de la subunidad ribosomal 18S. Los partidores utilizados fueron: forward 5'-TCA AGA ACG AAA GTC GGA GG-3` y reverse 5'-GGA CAT CTA AGG GCA TCA CA-3` (26). La amplificación del mensajero de 18S fue llevada a cabo en un tubo separado para evitar interferencias en la

amplificación. En los controles negativos se reemplazó el cDNA por H<sub>2</sub>O nanopura, en la reacción de PCR.

### **2.11. Análisis Estadístico.**

Los resultados se expresaron como el promedio  $\pm$  error estándar. Para determinar diferencias significativas entre distintos grupos se realizó un análisis de varianza en un sólo sentido (ANOVA) seguido de un test de Newman-Keuls post-hoc.

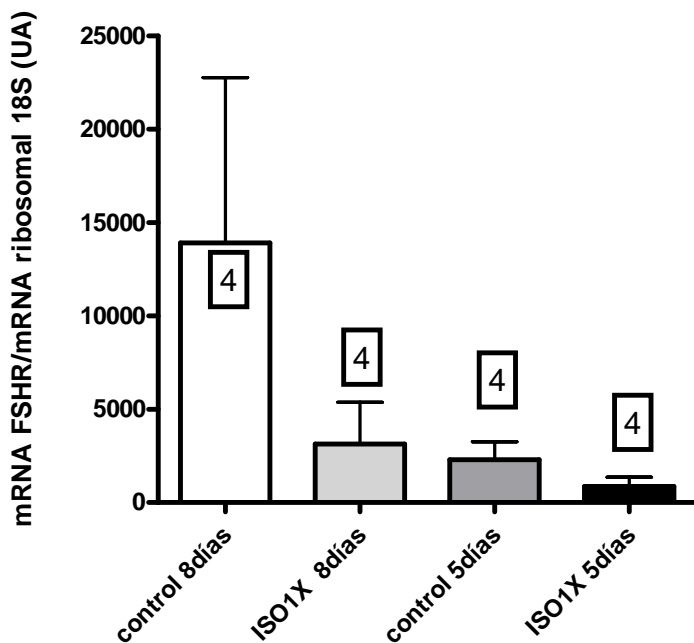
### 3. RESULTADOS

Los resultados serán expuestos siguiendo un orden temporal: 1) etapa neonatal, 2) etapa peripuberal y 3) etapa adulta. Los estudios en la etapa peripuberal hacen referencia a aquellos resultados obtenidos entre el momento en que la rata inicio la pubertad y cuando ocurrió la eutanasia.

#### 3.1. ETAPA NEONATAL

##### 3.1.1. Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre la expresión del receptor de FSH.

Se midió el mensajero del receptor de FSH, para ver si se producen cambios en la expresión de dicho receptor a causa de la estimulación  $\beta$  adrenérgica durante los primeros 5 días de vida con ISO en una dosis de 125  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso. En la figura N° 3 se aprecia que la cantidad de mensajero disminuye a los 8 y 5 días en las ratas tratadas respecto a sus controles.



**Figura N° 3:** Efecto de la exposición neonatal con ISO sobre la expresión del mRNA del FSHR en ratas neonatas de 5 y 8 días de vida.

La dosis de ISO utilizada fue de 125  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso. Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar de 4 experimentos por cada grupo experimental.

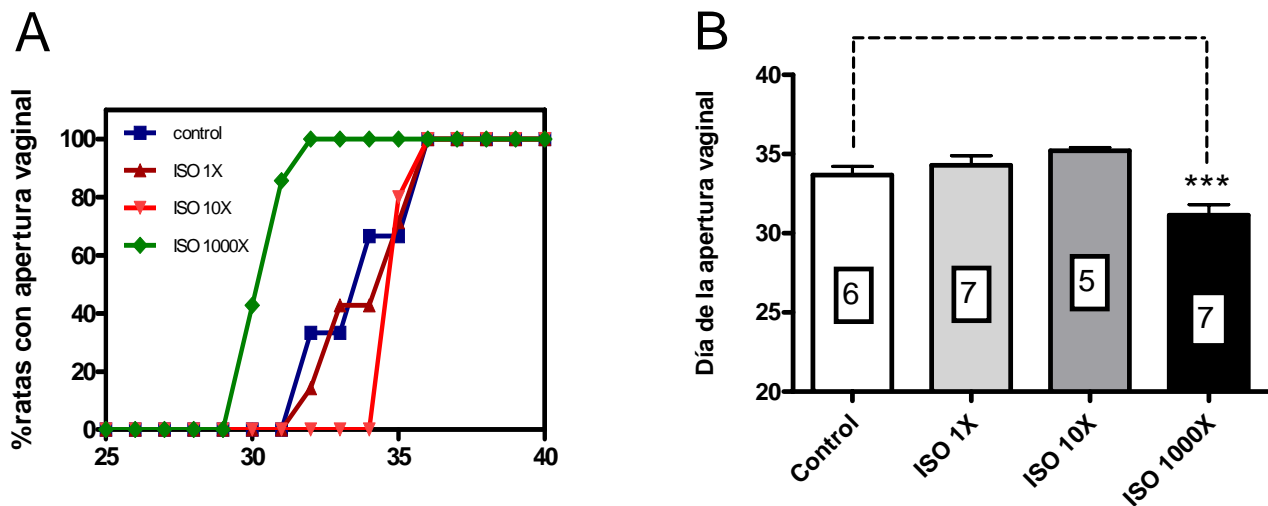


Los cambios en los 8 días no son significativos debido a la dispersión. Tampoco hay significancia a los 5 días entre el grupo control y las ratas tratadas. Éste experimento solo fue realizado en el grupo 1X, dado que la obtención de las muestras requería de un número considerable de ratas (cerca de 96 animales en total).

### 3.2. ETAPA PERIPUBERAL.

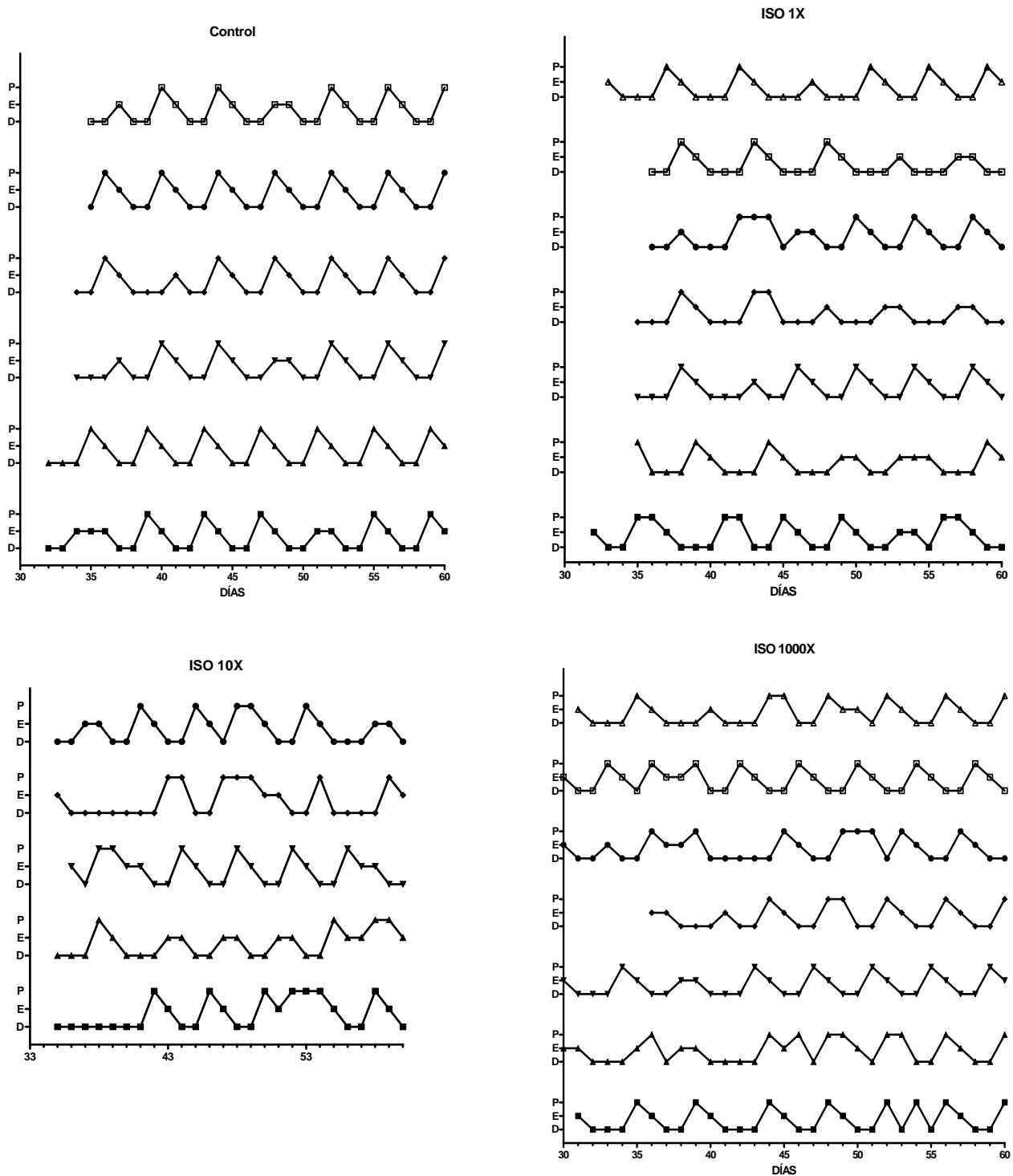
#### 3.2.1. Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre la pubertad y ciclicidad estral.

El inicio de la pubertad se puede determinar conociendo el día en que ocurre la apertura del canal vaginal. En la figura N° 4 se observa que la pubertad sólo se adelantó de manera significativa en las ratas que fueron expuestas neonatalmente a ISO 1000X. En estas ratas se produjo la apertura vaginal a los 31,1 días, en promedio, mientras que en el grupo control la apertura se produjo en promedio el día 33,7. En el grupo ISO 1X la apertura vaginal ocurrió a los 34,3 días y en el grupo ISO 10X la apertura fue a los 35,2 días.



**Figura N° 3 :** Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre el inicio de la pubertad. En la figura A se muestra el porcentaje de ratas que presentan apertura vaginal de acuerdo a los días de edad. En la figura B se muestra el día promedio en que se produjo la apertura vaginal. Los resultados en B están expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar. El numero de muestras por grupo fue: control,n=6; ISO 1X,n=7; ISO 10X,n=6; ISO 1000X,n=7. \*\* =  $P < 0,01$  v/s control

En la figura N° 5 se muestran los ciclos estrales de los distintos grupos experimentales.



**Figura N° 4:** Efecto de la exposición neonatal con ISO sobre la ciclicidad estral en los distintos grupos experimentales desde que ocurrió la apertura vaginal hasta el fin del segundo mes de vida. P = proestro, E = estro y D = diestro.

La actividad cíclica reproductiva no se afectó notablemente por el tratamiento. Todas las ratas tratadas neonatalmente con ISO en distintas dosis ciclaron de forma regular cuando adultas, lo que queda en evidencia en la figura N° 6.

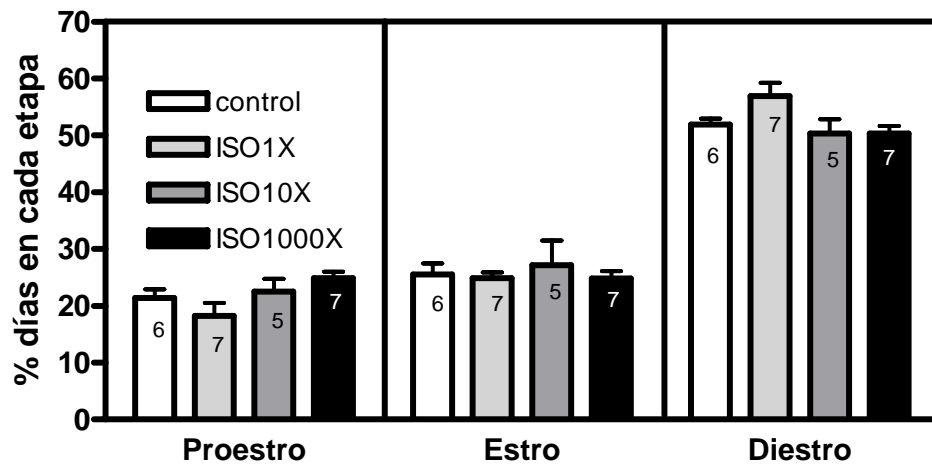
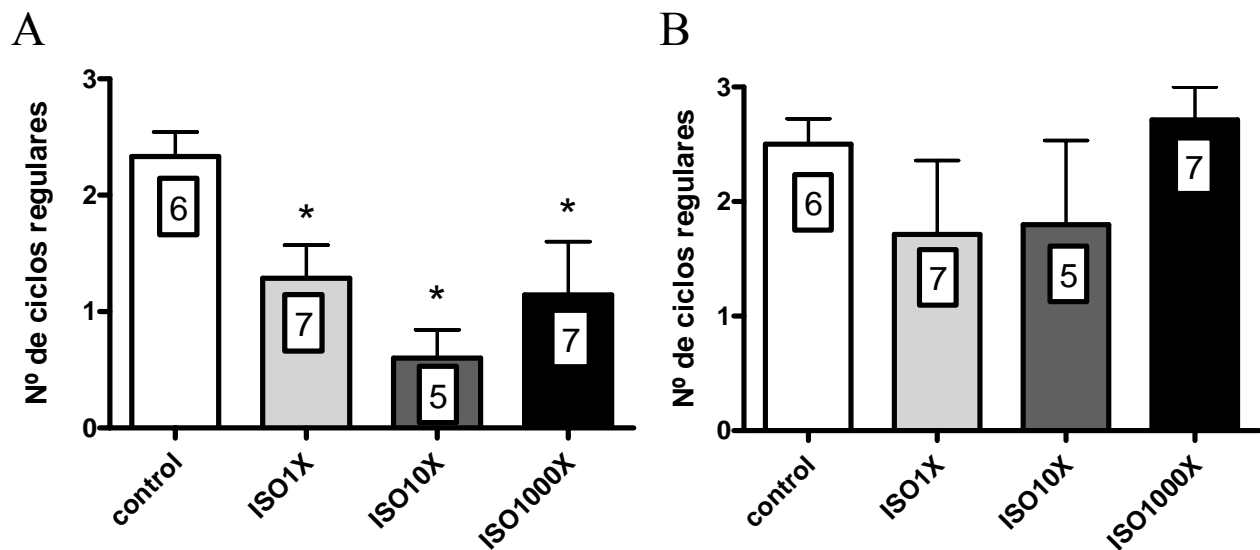


Figura N° 5 : Efecto de la exposición neonatal con ISO sobre el porcentaje de días de permanencia en cada etapa del ciclo estral. Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar. El número de mediciones para cada grupo es: control n=6; ISO 1X n=7; ISO 10X n=5; ISO 1000X n=7.

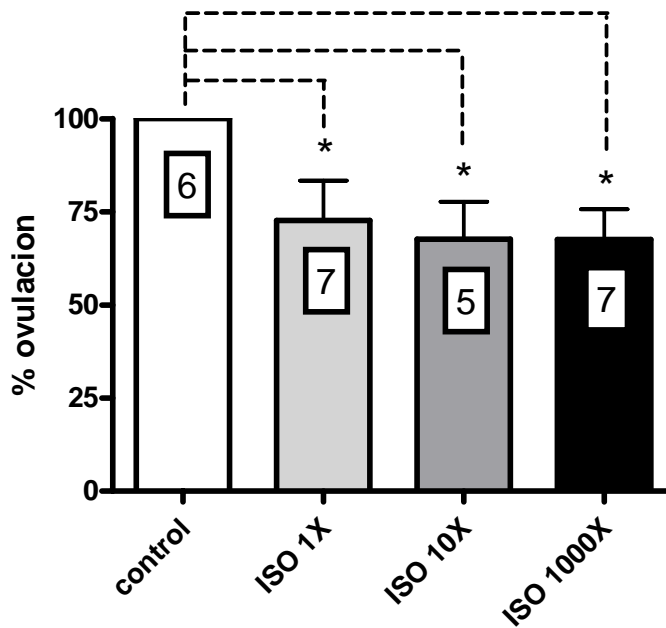
En esta figura se muestra el porcentaje de permanencia de cada etapa del ciclo estral en los distintos grupos desde el momento en que se inició la pubertad hasta el momento de ser sacrificadas, lo que ocurrió en un lapso cercano a los 30 días. Durante todo este período no se observan cambios significativos en el porcentaje de permanencia en las distintas etapas del ciclo en todos los animales tratados respecto al control. Se puede observar que las ratas permanecen 25% tanto en proestro como en estro y el 50% restante permanece en diestro. Esto tiene sentido si consideramos que el proestro dura entre 12 y 14 horas, el estro dura entre 25 y 27 horas y el diestro entre 55 y 57 horas (27).

Sin embargo, si realizamos un análisis más minucioso dividiendo el período durante el cual se supervisó el ciclo estral en dos períodos de igual duración (aproximadamente dos semanas), como se observa en la figura N° 7, y se analiza el número de ciclos regulares, que se define como el paso de proestro a estro y posteriormente a diestro, se pueden apreciar cambios entre los grupos tratados y el grupo control. Durante las semanas 1 y 2 (figura 7A) se observa una disminución en el número de ciclos regulares casi de una manera dosis dependiente, mientras que en las semanas 3 y 4 (figura 7B) los ciclos se hacen más regulares.



**Figura N° 6:** Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre la cantidad de ciclos estrales regulares. Durante las semanas 1 y 2 después del inicio de la pubertad (A), y durante las semanas 3 y 4 después del inicio de la pubertad (B). Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar de al menos 5 mediciones. \* =  $P < 0.05$  v/s control.

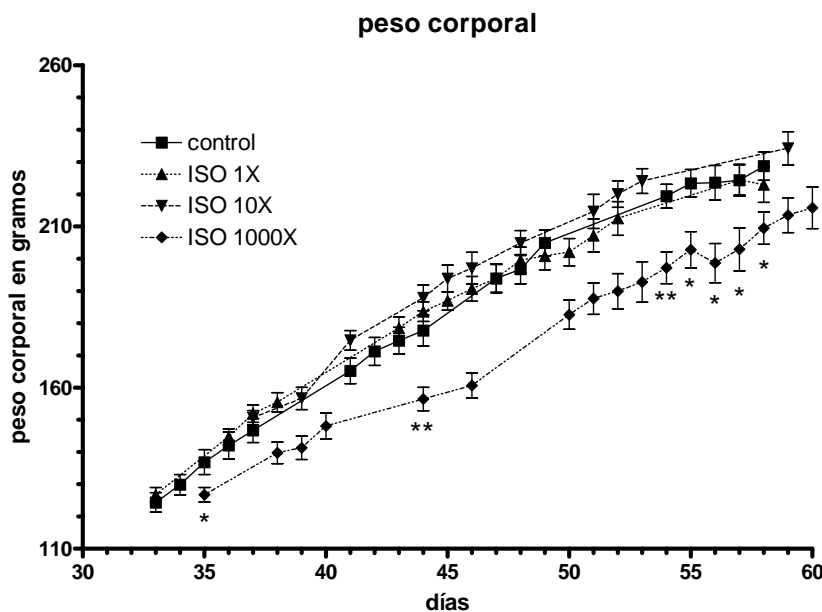
El porcentaje de ovulación se define como la cantidad de transiciones de proestro a estro respecto al número total de veces que la rata estuvo en proestro. El porcentaje de ovulación se vio disminuído significativamente (figura N° 8) en todos los grupos tratados con ISO en el período neonatal ( $P < 0.05$ ).



**Figura N° 7:** Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre el porcentaje de ovulación. Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar. El número de muestras por grupo fue: control, n=6; ISO1 X, n=7; ISO 10X, n=5; ISO 1000X, n=7. \* =  $P < 0,05$  v/s control.

### 3.2.2. Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre el peso corporal.

En la figura N° 9 se observa que el tratamiento con ISO modificó el peso corporal de las ratas sólo en la dosis más alta, ISO 1000X, en donde se aprecia una disminución significativa de los pesos corporales respecto al grupo control.



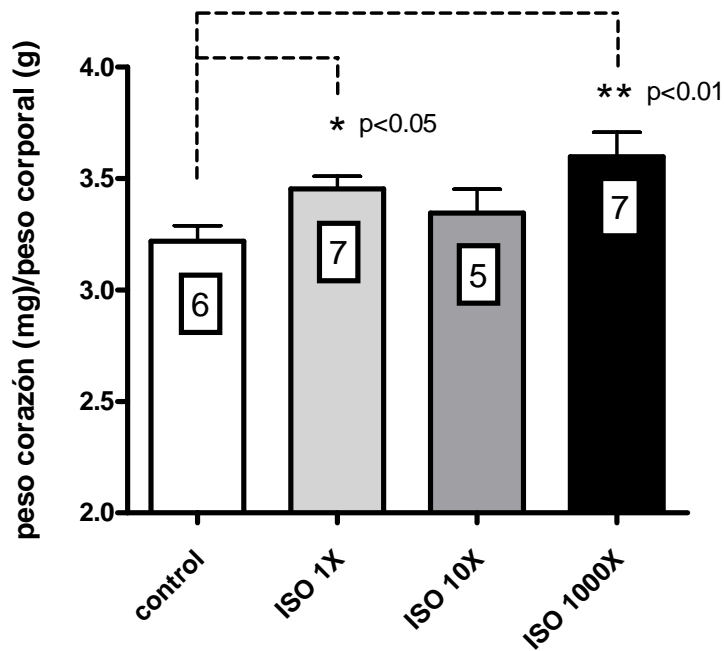
**Figura N° 8:** Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre el peso corporal de las ratas durante el segundo mes de vida.

Los resultados están expresados en gramos y corresponden al promedio  $\pm$  el error estándar. El número de muestras por grupo fue: control, n=6; ISO 1X, n=7; ISO 10X, n=5; ISO 1000X, n=7. \* =  $P < 0,05$  y \*\* =  $P < 0,01$ .

### 3.3. ETAPA ADULTA

#### 3.3.1. Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre los pesos de los corazones.

Dado que el ISO en las dosis utilizadas produce hipertrofia cardíaca (24), es una buena forma de controlar la efectividad del tratamiento. Por lo tanto para asegurarnos que el tratamiento con ISO fue efectivo, se pesaron los corazones de los animales. En la figura N° 10 se presentan los pesos relativos de los corazones de ratas de 2 meses, expresados como mg de tejido cardíaco / g de peso corporal. Los pesos de los corazones aumentaron de manera significativa respecto al control en los grupos ISO 1X ( $p < 0.05$ ) e ISO 1000X ( $p < 0.01$ ). Si bien el grupo ISO 10X no presenta un aumento significativo en el peso del corazón, muestra una tendencia al alza.



**Figura N° 9 :** Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre el peso del corazón. En el grafico se muestran los pesos relativos de los corazones en los distintos grupos experimentales. Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar. El numero de muestras por grupo fue: control,n=6; ISO 1X,n=7; ISO 10X,n=5; ISO 1000X, n=7. \* =  $P < 0,5$  v/s control, \*\* =  $P < 0,01$  v/s control.

### 3.3.2. Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre el peso de los ovarios.

En la figura N° 11 se observa que la exposición neonatal a ISO en las distintas dosis no fue capaz de modificar de manera significativa el peso relativo del ovario cuando adulta, respecto al control.

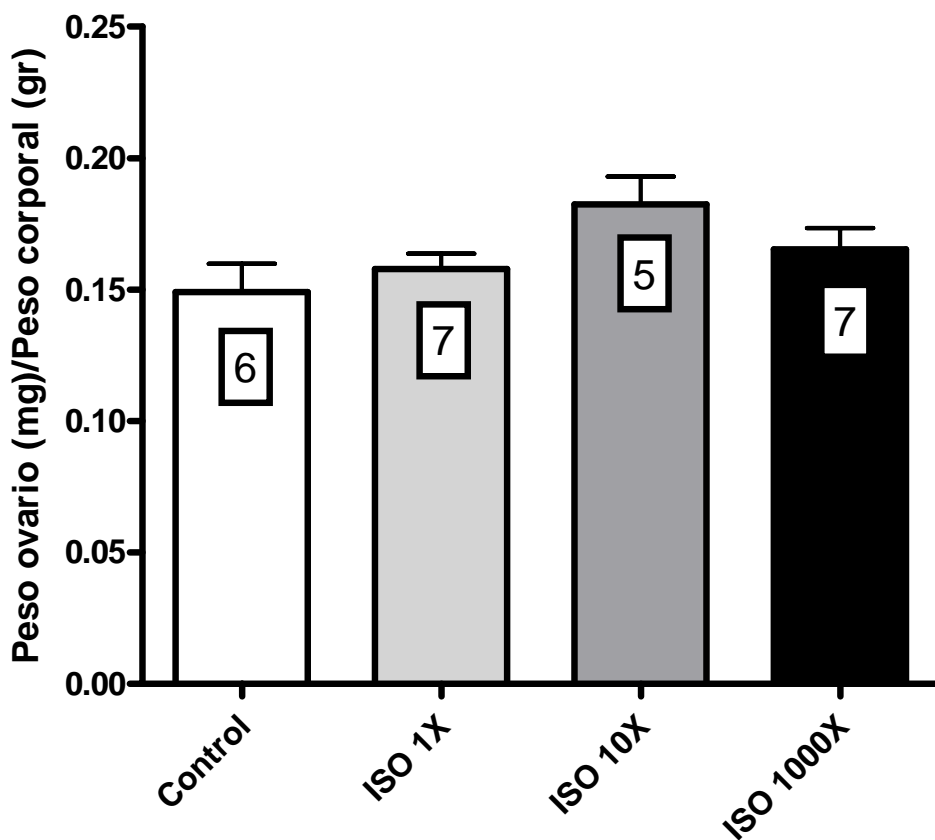
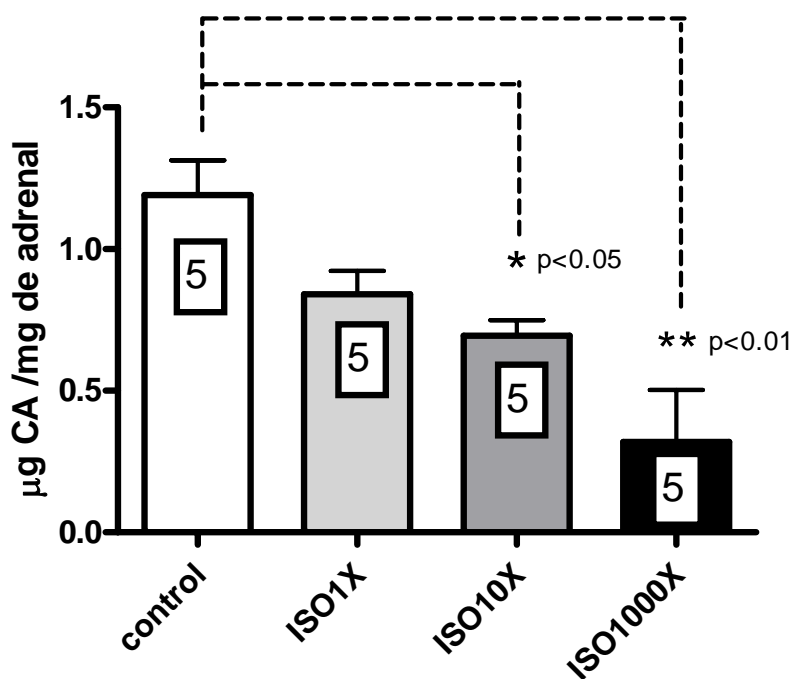


Figura N° 10: Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre el peso relativo del ovario. Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar. El número de muestras por grupo fue: control, n=6; ISO 1X, n=7; ISO 10X, n=5; ISO 1000X, n=7.

### 3.3.3. Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre el contenido de catecolaminas adrenales.

Como se observa en la figura N° 12, la exposición neonatal a ISO durante el periodo neonatal provocó una disminución en el contenido relativo de catecolaminas adrenales en la etapa adulta respecto al grupo control. Esta disminución fue significativa para los grupos ISO 10X ( $P < 0,05$ ) e ISO 1000X ( $P < 0,01$ ). El grupo ISO 1X presentó solo una tendencia a disminuir respecto al control.



**Figura N° 11:** Efecto de la exposición neonatal con ISO sobre el contenido de las catecolaminas totales en la glándula adrenal. Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar de 5 mediciones. \* =  $P < 0,05$  v/s control, \*\* =  $P < 0,01$  v/s control.



### 3.3.4. Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre el contenido de NA en el ganglio celíaco.

Como se observa en la figura N° 13, los niveles de NA en el ganglio celíaco de las ratas tratadas con ISO no experimentaron cambios significativos en ninguna de las dosis respecto al control. Cabe mencionar que el grupo ISO 10X mostró una tendencia al aumento de un 33.5% respecto al control.

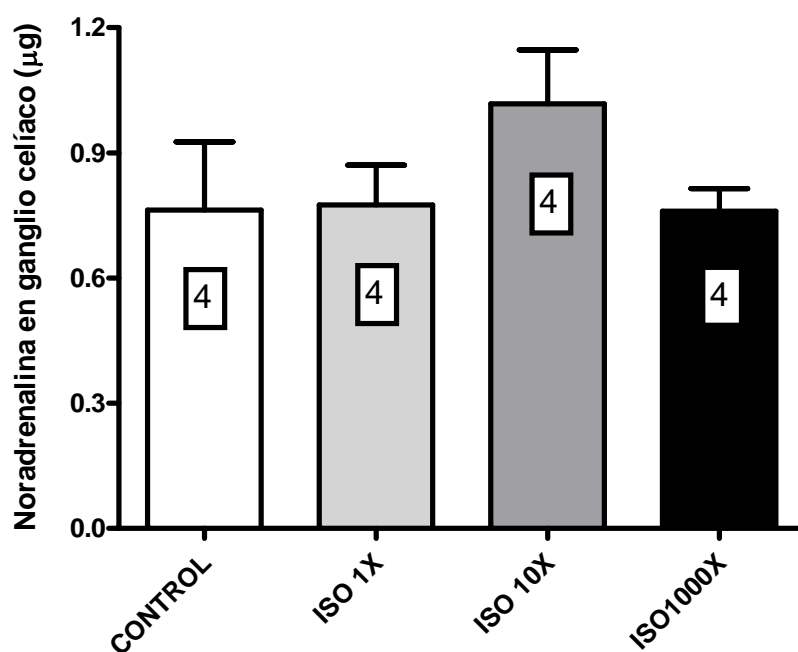
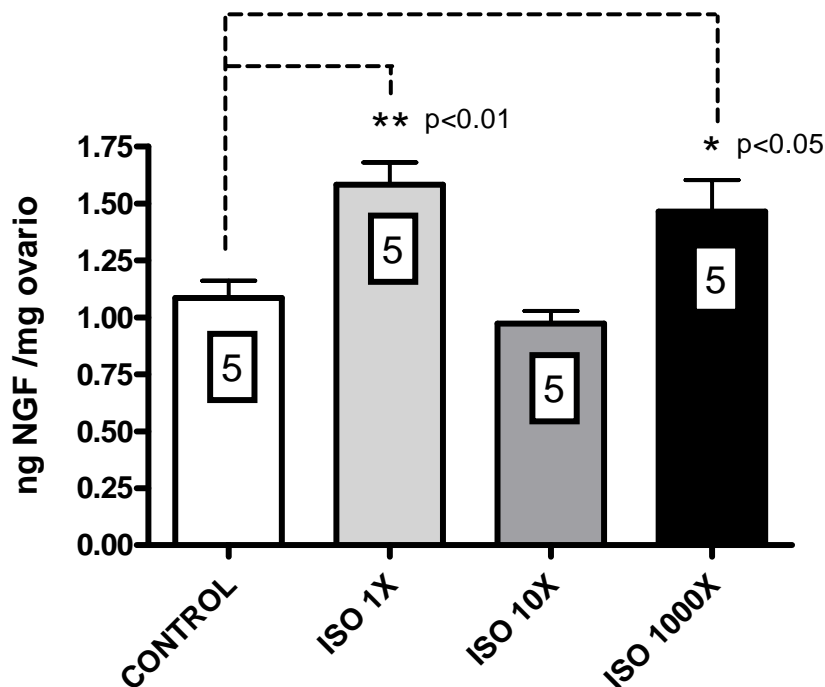


Figura N° 12: Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre el contenido de NA en el ganglio celíaco. Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar de cuatro experimentos distintos por grupo.

### 3.3.5. Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre el contenido de NGF ovárico.

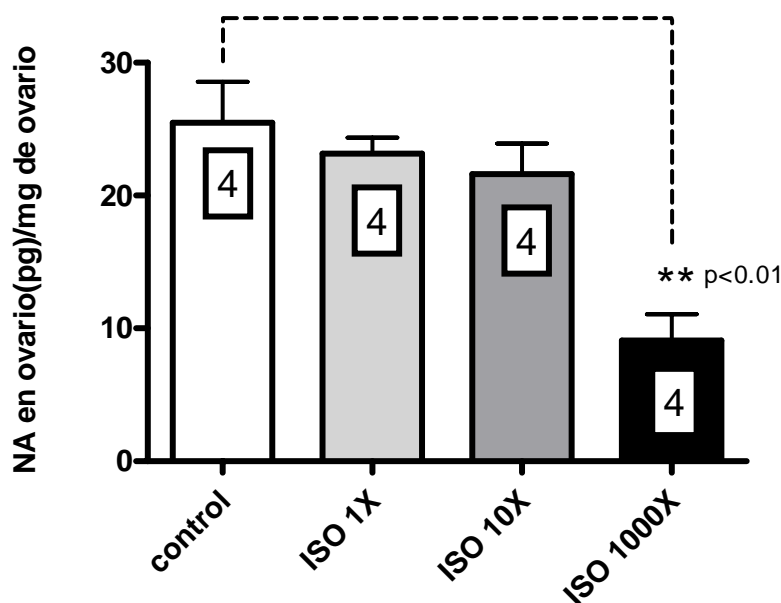
Como se observa en la figura N° 14, el contenido de NGF medido en el homogenizado de ovario aumentó significativamente respecto al grupo control en los grupos ISO 1X e ISO 1000X ( $P < 0,01$  y  $P < 0,05$ , respectivamente). En el grupo ISO 1X aumentó el contenido de NGF ovárico en un 45.8%, mientras que en el grupo ISO 1000X el aumento fue de un 34.9%. El grupo ISO 10X no presentó cambios significativos respecto al control.



**Figura N° 13:** Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre el contenido de NGF ovárico expresado en nanogramos y normalizado por el peso del ovario en miligramos. Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar de 5 mediciones para cada grupo experimental. \* =  $P < 0,05$  v/s control, \*\* =  $P < 0,01$  v/s control.

### 3.3.6. Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre el contenido ovárico de NA.

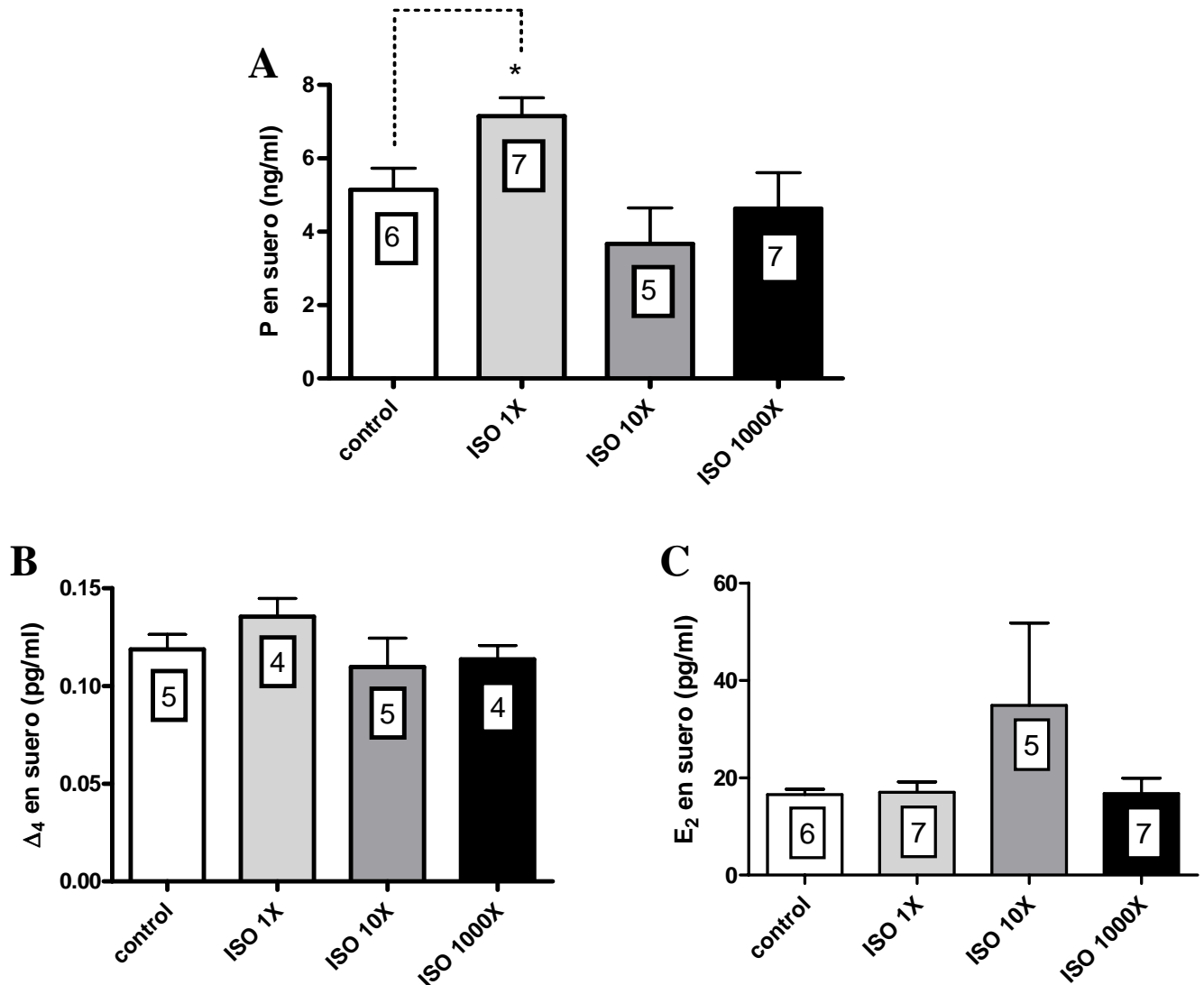
Como se observa en la figura N° 15, la exposición neonatal a ISO 1000X produjo una disminución significativa del contenido de NA ovárica en la etapa adulta respecto al control ( $P < 0.01$ ). Las dosis ISO 1X e ISO10X no cambiaron de manera significativa en comparación al grupo control.



**Figura N° 14:** Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre el contenido de NA ovárica en los distintos grupos experimentales. Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar de cuatro experimentos distintos por grupo. \*\*\* =  $P < 0,001$  v/s control.

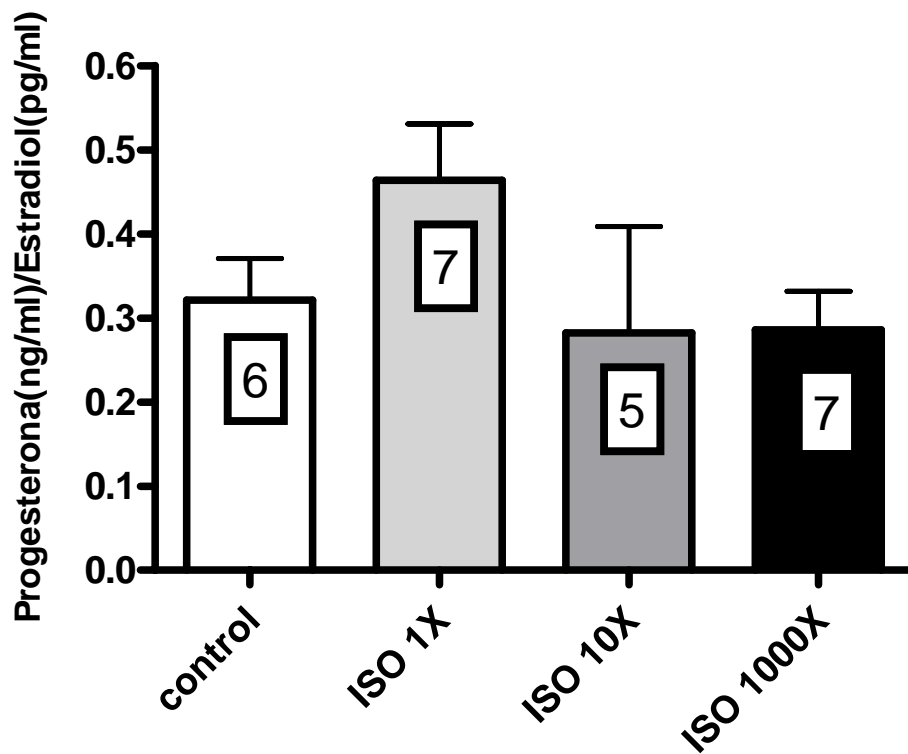
### 3.3.7. Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre las hormonas esteroidales en suero.

En la figura N° 16 se observa que los niveles séricos de progesterona aumentaron significativamente en el grupo ISO 1X respecto al control ( $P < 0,05$ ), en los grupos ISO 10X e ISO 1000X no se observaron cambios significativos. Los niveles de androstenediona y estradiol séricos no cambiaron de manera significativa en las ratas tratadas respecto al control.



**Figura N° 15 :** Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre los niveles séricos de hormonas esteroidales. En A observamos la concentración de progesterona en suero, en B concentración de androstenediona en suero y en C concentración de estradiol en suero. En cada figura se muestra el promedio  $\pm$  el error estándar. En los tres ensayos se realizó el mismo número de determinaciones, que consistió en: control, n=6 ; ISO 1X, n=7; ISO 10X, n=5; ISO 1000X, n=7.\* =  $P < 0.05$ .

La razón progesterona / estradiol, como se muestra en la figura N° 17, que da cuenta de la función lútea, no cambió de manera significativa en las ratas tratadas respecto al grupo control, sin embargo, cabe mencionar que el grupo ISO 1X muestra una tendencia al aumento.



**Figura N° 16:** Efecto de la exposición neonatal a ISO sobre la función lútea. Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar. El numero de muestras por grupo fue: control, n=6; ISO 1X, n=7; ISO 10X, n=5; ISO 1000X, n=7.

## 4. DISCUSION

Existe mucha evidencia que apoya la teoría de que la inervación simpática que llega al ovario podría estar involucrada en la etiología del PCO. En investigaciones previas desarrolladas en nuestro laboratorio se estudió a distintos niveles el posible rol de la inervación simpática en el desarrollo de dicha patología. En primer lugar se estudió la participación del EV en la activación de los nervios simpáticos del ovario que da lugar a la formación de quistes (19). Para discriminar de un efecto directo del estradiol como factor etiológico en la formación de quistes, posteriormente se estudió la capacidad del estrés para activar los nervios simpáticos del ovario e inducir la formación de quistes (28). Sin embargo, el estrés involucra complejas respuestas neuroendocrinas, por lo tanto, para poder estudiar de manera más directa el efecto real de la activación de los nervios simpáticos del ovario en la formación de quistes, administramos el agonista beta-adrenérgico, ISO. De esta forma remedamos una activación de los nervios simpáticos en el ovario en el período neonatal para observar el efecto de este procedimiento en la función reproductiva en la etapa adulta.

### *4.1. Efectos del tratamiento neonatal con ISO sobre la fisiología reproductiva.*

La administración de una dosis de ISO 1000X redujo el peso de las ratas respecto al control (Figura 9). Esto puede explicarse por que la estimulación adrenérgica promueve el aumento en los niveles de cAMP, lo que activa a PKA lo que finalmente fosforila a HSL (lipasa sensible a hormona), promoviéndose la lipólisis (29).

En estudios previos, la administración de ISO a ratas adultas provoca hipertrofia cardíaca (24). El propósito de pesar los corazones es comprobar si la administración neonatal de ISO produjo un efecto en el desarrollo del corazón que se mantenga en el tiempo y que sea similar al que se

produce cuando la administración es en adultos. Por ello al comprobar que los pesos de los corazones de las ratas aumentaron de forma significativa (Figura 10) podemos decir que el fármaco fue administrado de forma correcta y que el ISO administrado en el período neonatal programó la función cardíaca, produciendo una hipertrofia del corazón que se mantuvo hasta la vida adulta.

El tratamiento produjo un adelanto en la aparición de la pubertad, manifestándose como un adelanto en la apertura vaginal, tal como se aprecia en la figura 4. Según lo descrito por la bibliografía, el ISO es capaz de inducir la expresión del receptor de FSH y la aromatasa in Vitro en ovarios de ratas de 2 días de vida (23). Los ovarios expresaron los mRNA del receptor de FSH y la aromatasa a las 8 horas de exposición a ISO. Además, en este mismo experimento se demostró que ese aumento en la expresión del mRNA del FSHR se traducía en la expresión de un receptor funcional, puesto que se producía crecimiento folicular al administrar FSH al medio donde se cultivó el ovario (23). Sin embargo, al medir los niveles de mRNA de FSH por PCR en tiempo real, obtuvimos una disminución del mensajero del gen FSHR, como se aprecia en la figura N° 3. Según nuestros resultados, el tratamiento con ISO produjo una disminución no significativa en los niveles del mRNA del FSHR. Es probable que los niveles de la proteína se encuentren elevados aún estando bajos los niveles del mensajero, dado que no siempre existe una correlación entre mRNA y proteína (30;31). Sería bueno para confirmar esta teoría cuantificar los niveles de proteína por westernblot o inmunohistoquímica. También se pudo haber medido por PCR los niveles del mRNA de la aromatasa, dado que la expresión del FSHR induce la expresión de la aromatasa. Otra probable explicación es que in vivo el solo incremento en los niveles de cAMP inducido por ISO, estimule la esteroidogénesis en el ovario inmaduro, con lo que se adelanta el desarrollo folicular y junto con ello la pubertad. Otra posibilidad que cabe nombrar, es que el ISO haya activado las neuronas GnRH del hipotálamo, facilitando la descarga pulsátil de

esta hormona. Está demostrado que la estimulación beta adrenérgica aumenta la descarga de GnRH desde el hipotálamo (32). Sin embargo, para que ocurra esto el ISO debiera ser capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, lo que es poco probable dada su alta polaridad (33).

Según los antecedentes, la administración de ISO en las dosis usadas es suficiente para inducir la aparición de quistes ováricos en ratas adultas (34). La condición quística inducida por ISO no se asemeja a la inducida por EV, en el primer caso el ovario presenta pocos quistes (no superan el 20% de la población folicular) y además hay presencia de cuerpos lúteos (34), mientras que en el caso del EV presenta mayor cantidad de quistes y no hay cuerpos lúteos (18), lo que reduce considerablemente el peso del ovario, dado que los cuerpos luteos son los que contribuyen en mayor medida al peso. Según nuestros resultados los ovarios de las ratas tratadas neonatalmente con ISO presentaban pesos similares a los ovarios del grupo control (figura 11), lo que se explica porque el ovario, a pesar de que presentó una actividad cíclica irregular, siguió ovulando. Esto se aprecia en el porcentaje de ovulación que se muestra en la figura 8, las ratas controles presentaron un porcentaje de ovulación de un 100%, las ratas tratadas disminuyeron el porcentaje de ovulación, pero no dejaron de ovular (el porcentaje no fue menor de un 60%). La ovulación se confirmó con la presencia de cuerpos lúteos en la histología (datos no publicados) y con la cuantificación de progesterona en el suero de las ratas (figura 16). Es probable que no se hayan generado quistes, puesto que el período en que se estimuló a las ratas no fue el adecuado, es decir, no es la ventana adecuada para producir cambios permanentes sobre el desarrollo folicular. La formación de quistes es un proceso secuencial en el que en primer lugar se desarrollan estructuras prequísticas por efecto del aumento en NGF, y posteriormente estos folículos prequísticos se transforman en quistes por efecto de la NA aumentada. Esta suposición encuentra apoyo en los experimentos en donde se inyectan células sobreproductoras de NGF y aumenta el número de estructuras prequísticas, sin cambios en el número de quistes (35). La inyección de



ISO produce un aumento en el número de quistes, pero no cambia significativamente el número de estructuras prequísticas (36). Otro antecedente es que la inyección de EV en ratas neonatas produce un aumento de NGF casi inmediato (36 horas luego de la administración de EV), y en la etapa adulta estas ratas presentan un aumento significativo en el contenido de NA en el ovario de la mano de un aumento en el número de quistes (21). Es probable que en el presente modelo no existiera esa población de folículos prequísticos si suponemos que el NGF se encuentra bajo en las etapas tempranas, y por lo tanto el ISO no pudo producir los quistes.

Los resultados de esta memoria muestran que no hubo cambios en los niveles de esteroides plasmáticos en la etapa adulta de las ratas tratadas en el período neonatal con ISO (figura N° 16), la progesterona en las ratas tratadas está en niveles similares a las del grupo control. La androstenediona y el estradiol también se encuentran en niveles normales. Según lo descrito por la literatura el ISO es capaz de inducir la esteroidogénesis. Al cultivar el ovario en ISO durante 4 días éste es capaz de secretar progesterona en cantidades similares a las que se obtienen tras estimular con hormona luteinizante (37). Esto se debe a que la estimulación beta adrenérgica aumenta los niveles de cAMP de igual modo que las gonadotropinas. Al parecer la estimulación adrenérgica en el período neonatal no produjo cambios que perduraran en el tiempo. Hubiera sido conveniente medir la secreción de los esteroides desde el ovario, dado que esto es una mejor forma de ver si aumentó la actividad secretora del ovario. Es probable que los esteroides no estuvieran aumentados porque el estímulo que se aplicó al inicio se fue diluyendo hasta dejar de manifestarse. Por esta razón sería oportuno medir los niveles séricos de esteroides o bien medir la capacidad secretora de esteroides en la rata neonata de 5 y 8 días de vida o en la etapa peripuberal.

#### 4.2. Efectos del tratamiento neonatal con ISO en el control nervioso

La exposición neonatal a ISO produjo una disminución del contenido de NA en la glándula adrenal en una forma dosis dependiente. En estudios previos se analizó el efecto de la administración de ISO a células de la medula adrenal aisladas y el resultado fue un aumento en la secreción de catecolaminas en una condición basal, esto es en ausencia de acetilcolina, y además tiene un efecto aditivo en la liberación de catecolaminas cuando se estimula con acetilcolina (38). Por otro lado las catecolaminas *per se* pueden regular su propia liberación mediante un feedback negativo probablemente mediado por los receptores alfa adrenérgicos presinápticos (38). En nuestro modelo experimental, podría estar ocurriendo una activación de la secreción de catecolaminas por efecto del ISO en el corto plazo, pero este aumento en la secreción en una etapa temprana del desarrollo podría estar programando la función de la médula adrenal en la etapa adulta, disminuyendo la liberación y/o la síntesis de catecolaminas en la glándula.

El contenido de NA ovárica en la etapa adulta disminuyó en las ratas tratadas neonatalmente con la dosis de ISO más alta (ISO 1000X). El contenido de NGF en ovario por otro lado aumentó solo en el grupo ISO 1X e ISO 1000X, mientras que en el grupo ISO 10X no cambió respecto al control. Nosotros esperábamos que el contenido de NGF estuviera elevado respecto al control considerando el antecedente que el clenbuterol, un agonista beta2-adrenérgico aumentaba la expresión de NGF en el sistema nervioso central (39). Además un aumento de NGF trae consigo un aumento en el contenido de NA debido al aumento de la expresión de la enzima tirosina hidroxilasa, enzima marcapaso en la síntesis de catecolaminas.

Por otro lado el aumento en el contenido de NGF en el ovario produce cambios en la morfología produciendo un aumento de estructuras prequísticas que podrían ser confirmadas por microscopía, (lo que está pendiente).

El ganglio celiaco no mostró cambios en el contenido de NA en las ratas tratadas neonatalmente con ISO, en ninguna de las dosis, respecto a las del grupo control. Esto nos permite inferir que la ruta nerviosa que se inicia en el núcleo paraventricular del hipotálamo, y que pasa por el ganglio celiaco y llega al ovario por el nervio ovárico superior no se encuentra activada y los cambios en el contenido de NA en el ovario se produjeron por un cambio a nivel local.

## **5. CONCLUSIONES.**

- Las ratas estimuladas con ISO en el periodo neonatal no desarrollaron PCO cuando adultas, a diferencia de la exposición a ISO a ratas adultas en que sí desarrollan quistes ováricos.
- Los cambios en la actividad cíclica al comienzo del desarrollo prepuberal y la aparición de pubertad precoz, indica que la estimulación adrenérgica neonatal puede afectar la sincronización del eje hipotálamo-hipófisis-ovario responsable del inicio de la actividad cíclica reproductiva.
- El período en que se estimuló no provocó cambios permanentes en la función ovárica
- La estimulación adrenérgica neonatal modificó de forma permanente el tamaño del corazón y el contenido de catecolaminas adrenales. El hecho que exista un control negativo sobre la médula adrenal y ovario sugiere que este efecto puede ser debido a interacciones transneurales entre la inervación simpática del ovario y de la medula adrenal.

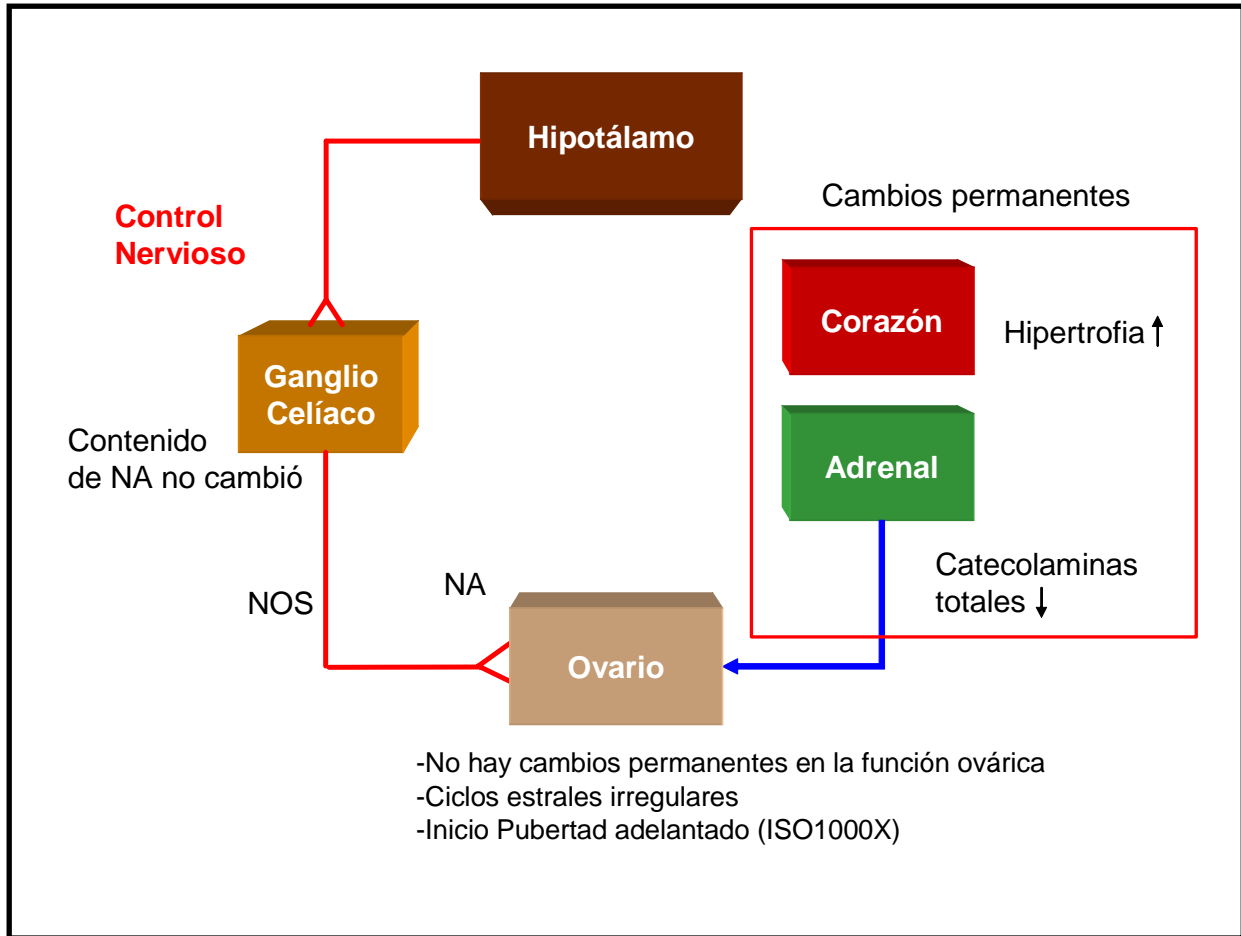


Figura N° 18: Diagrama resumen.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. **Ojeda SR** 1992 Female Reproductive Function. In: Griffin JE, Ojeda SR, eds. Textbook of Endocrine Physiology. Second ed. New York: Oxford University Press; 134-168
2. **Ganong WF** 2005 The Gonads: Development & Function of the Reproductive System. In: Foltin J, Lobowitz H, Brown RY, eds. Review of Medical Physiology. Twenty second ed. Mc Graw Hill; 411-453
3. **Rajah R, Glaser EM, Hirshfield AN** 1992 The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis. *Dev Dyn* 194:177-192
4. **Kurilo LF** 1981 Oogenesis in antenatal development in man. *Hum Genet* 57:86-92
5. **Dissen GA, Romero C, Paredes A, Dees WL, Ojeda SR** 2004 Neural and Neurotrophic Control of Ovarian Development. In: Leung PC, Adashi EY, eds. the Ovary. San Diego, California: Elsevier; 3-24
6. **White SS, Ojeda SR** 1981 Changes in ovarian luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptor content and in gonadotropin-induced ornithine decarboxylase activity during prepubertal and pubertal development of the female rat. *Endocrinology* 109:152-161
7. **Sokka T, Huhtaniemi I** 1990 Ontogeny of gonadotrophin receptors and gonadotrophin-stimulated cyclic AMP production in the neonatal rat ovary. *J Endocrinol* 127:297-303
8. **Gerendai I, Toth IE, Boldogkoi Z, Medveczky I, Halasz B** 1998 Neuronal labeling in the rat brain and spinal cord from the ovary using viral transneuronal tracing technique. *Neuroendocrinology* 68:244-256
9. **McDonald JK, Dees WL, Ahmed CE, Noe BD, Ojeda SR** 1987 Biochemical and immunocytochemical characterization of neuropeptide Y in the immature rat ovary. *Endocrinology* 120:1703-1710
10. **Klein CM, Burden HW** 1988 Substance P- and vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-immunoreactive nerve fibers in relation to ovarian postganglionic perikarya in para- and prevertebral ganglia: evidence from combined retrograde tracing and immunocytochemistry. *Cell Tissue Res* 252:403-410
11. **Lawrence IE, Jr., Burden HW** 1980 The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *Anat Rec* 196:51-59

12. **Burden HW** 1985 adrenergic innervation of mammalian ovaries. In: Ben-Jonathan N, Bahr JMA, Weiner RT, eds. *Catecholamines as hormone regulators*. New York: Raven Press
13. **Aguado LI, Ojeda SR** 1984 Ovarian adrenergic nerves play a role in maintaining preovulatory steroid secretion. *Endocrinology* 114:1944-1946
14. **Adashi EY, Hsueh AJ** 1981 Stimulation of beta 2-adrenergic responsiveness by follicle-stimulating hormone in rat granulosa cells in vitro and in vivo. *Endocrinology* 108:2170-2178
15. **Polson DW, Adams J, Wadsworth J, Franks S** 1988 Polycystic ovaries--a common finding in normal women. *Lancet* 1:870-872
16. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS) 2004 *Hum Reprod* 19:41-47
17. **Abdel GA, Khatim MS, Mowafi RS, Alnaser HM, Alzaid HG, Shaw RW** 1991 Polycystic ovaries: do these represent a specific endocrinopathy? *Br J Obstet Gynaecol* 98:300-305
18. **Brawer JR, Munoz M, Farookhi R** 1986 Development of the polycystic ovarian condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat. *Biol Reprod* 35:647-655
19. **Lara HE, Ferruz JL, Luza S, Bustamante DA, Borges Y, Ojeda SR** 1993 Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 133:2690-2695
20. **Barria A, Leyton V, Ojeda SR, Lara HE** 1993 Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology* 133:2696-2703
21. **Sotomayor-Zarate R, Dorfman M, Paredes A, Lara HE** 2008 Neonatal exposure to estradiol valerate programs ovarian sympathetic innervation and follicular development in the adult rat. *Biol Reprod* 78:673-680
22. **Ricu M, Paredes A, Greiner M, Ojeda SR, Lara HE** 2008 Functional development of the ovarian noradrenergic innervation. *Endocrinology* 149:50-56
23. **Mayerhofer A, Dissen GA, Costa ME, Ojeda SR** 1997 A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* 138:3320-3329
24. **Benjamin IJ, Jalil JE, Tan LB, Cho K, Weber KT, Clark WA** 1989 Isoproterenol-induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis. *Circ Res* 65:657-670
25. **Chomczynski P, Sacchi N** 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159

26. **Romero C, Paredes A, Dissen GA, Ojeda SR** 2002 Nerve growth factor induces the expression of functional FSH receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* 143:1485-1494
27. **Freeman ME** 2006 Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. In: Neill JD, ed. *Physiology of Reproduction*. Third edition ed. New York: Elsevier; 2327-2388
28. **Paredes A, Galvez A, Leyton V, Aravena G, Fiedler JL, Bustamante D, Lara HE** 1998 Stress promotes development of ovarian cysts in rats: the possible role of sympathetic nerve activation. *Endocrine* 8:309-315
29. **Robidoux J, Martin TL, Collins S** 2004 Beta-adrenergic receptors and regulation of energy expenditure: a family affair. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:297-323
30. **Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M** 2003 Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol* 4:117
31. **Nelson PT, Keller JN** 2007 RNA in brain disease: no longer just "the messenger in the middle". *J Neuropathol Exp Neurol* 66:461-468
32. **Ojeda SR, Terasawa E** 2002 Neuroendocrine regulation of puberty. In: Pfaff DW, Arnold AP, Etgen AM, Fahrbach SE, Rubin RT, eds. *Hormones, Brain and Behavior*. New York: Academic Press; 589-659
33. **Lülmann H, Hein L, Mohr K, Beger D** 2005 *Color Atlas of Pharmacology*. Third ed. New York: Thieme; 84-100
34. **Lara HE, Dorfman M, Venegas M, Luza SM, Luna SL, Mayerhofer A, Guimaraes MA, Rosa E Silva AA, Ramirez VD** 2002 Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary during a normal estrous cycle and in polycystic ovary syndrome: Studies on norepinephrine release. *Microsc Res Tech* 59:495-502
35. **Dissen GA, Lara HE, Leyton V, Paredes A, Hill DF, Costa ME, Martinez-Serrano A, Ojeda SR** 2000 Intraovarian excess of nerve growth factor increases androgen secretion and disrupts estrous cyclicity in the rat. *Endocrinology* 141:1073-1082
36. **Neumann S** 1997 Inducción de ovario poliquístico en ratas por estimulación adrenérgica. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico. Facultad de Medicina: Universidad de Valparaíso
37. **Lara HE, Porcile A, Espinoza J, Romero C, Luza SM, Fuhrer J, Miranda C, Roblero L** 2001 Release of norepinephrine from human ovary: coupling to steroidogenic response. *Endocrine* 15:187-192
38. **Greenberg A, Zinder O** 1982 Alpha- and beta-receptor control of catecholamine secretion from isolated adrenal medulla cells. *Cell Tissue Res* 226:655-665

39. **Semkova I, Schilling M, Henrich-Noack P, Rami A, Krieglstein J** 1996 Clenbuterol protects mouse cerebral cortex and rat hippocampus from ischemic damage and attenuates glutamate neurotoxicity in cultured hippocampal neurons by induction of NGF. *Brain Res* 717:44-54