



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y
FARMACÉUTICAS**

**SISTEMA NERVIOSO OVÁRICO INTRÍNSECO Y SU
ACTIVACIÓN DURANTE LA CONDICIÓN DE OVARIO
POLIQUÍSTICO**

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

MONIKA MARCELA GREINER GEBAUER

**Director de Tesis: Dr. Hernán Lara Peñaloza
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile**

**Santiago, Chile
2006**

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y
FARMACÉUTICAS**

Informe de Aprobación de Tesis de Doctorado

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, que la tesis de Doctorado en Bioquímica presentada por el candidato

MONIKA MARCELA GREINER GEBAUER

Ha sido aprobada por la Comisión informante de tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Bioquímica en Examen de Defensa de Tesis rendido el día _____

Director de Tesis
Dr. Hernán Lara Peñaloza _____

Comisión informante de Tesis

Dra. María Antonieta Valenzuela (Presidente) _____

Dra. María Eugenia Bruzzone _____

Dra. Katia Gysling _____

Dr. Luis Valladares _____

Dra. Cecilia Vergara _____

PUBLICACIONES, ASISTENCIA A CONGRESOS Y PREMIOS

PUBLICACIONES

GREINER M, PAREDES A, ARAYA V, LARA HE 2005 Role of stress and sympathetic innervation in the development of polycystic ovary syndrome. Endocrine 28(3):319-324.

GREINER M, MAYERHOFER A, LARA HE Regulation of the activity of intraovarian sympathetic neurons during polycystic ovary in the rat. En preparación.

ASISTENCIA A CONGRESOS

2005 XVI REUNIÓN ANUAL SOCIEDAD CHILENA DE REPRODUCCIÓN Y DESARROLLO, REÑACA, CHILE **Greiner M**; Mayerhofer A; Lara HE. *Participación del transportador de Dopamina en el aumento de la actividad nerviosa en la condición de ovario poliquístico en rata.*

2005 XVI REUNIÓN ANUAL SOCIEDAD CHILENA DE REPRODUCCIÓN Y DESARROLLO, REÑACA, CHILE Lara HE; Ricu M; **Greiner M**; Paredes A. *Reprogramación del eje neuroendocrino. Efectos de Estradiol sobre el sistema nervioso autónomo del ovario de rata.*

2004 NEUROSCIENCE MEETING, SAN DIEGO, CALIFORNIA, EE.UU. **Greiner MM**; Dorfman M; Fiedler JL; Lara HE; *Activation of an intraovarian noradrenergic system during polycystic ovary.* 756.22 2004 Abstract Viewer Itinerary Planner, Washington D.C., Society for Neuroscience 2004. Online.

2004 XXVI CONGRESO SOCIEDAD DE FARMACOLOGÍA DE CHILE, TERMAS DE QUINAMÁVIDA, CHILE Participación en Simposio: Mecanismos de control neuroendocrino de la función ovárica. Participación del sistema nervioso autónomo y el eje hipotálamo, hipófisis, ovario en el control neuroendocrino de la función ovárica. *“Neuronas intraováricas. Participación en la mantención de la hiperactividad noradrenérgica en ovario poliquístico”*
Greiner M, Dorfman M, Lara HE.

2004 XV REUNIÓN ANUAL SOCIEDAD CHILENA DE REPRODUCCIÓN Y DESARROLLO, EL QUISCO, CHILE *“Activación de las neuronas intraováricas en el ovario poliquístico”* **Greiner M**, Dorfman M, Lara HE. Trabajo de incorporación

2003 XXV CONGRESO SOCIEDAD DE FARMACOLOGÍA DE CHILE, TOMÉ, CHILE *“El ovario de rata presenta mRNA para tirosina hidroxilasa”* **Greiner M**, Venegas M, Fiedler JL, Lara HE.

2003 XIV REUNIÓN ANUAL SOCIEDAD CHILENA DE REPRODUCCIÓN Y DESARROLLO, LA SERENA, CHILE *“Activación de circuito neuronal intrínseco en el ovario poliquístico”* **Greiner M**, Fiedler JL, Lara HE.

BECAS

2005 Beca de financiamiento parcial de término de Tesis de Doctorado otorgado por la Dirección de Postgrado y Postítulo de la Universidad de Chile, PG 63/2004.

2005 Beca “Graduirtenkolleg 333 Biologie Menschlicher Erkrankungen” Universidad de Munich, Alemania, Estadía de Investigación Laboratorio Dr. Artur Mayerhofer (febrero 2005).

2004 Beca CONICYT para asistencia a Congresos en el Extranjero (Neuroscience Meeting 2004, San Diego, California, EE.UU.).

2003 Beca de apoyo realización de Tesis Doctoral CONICYT.

2002 Beca de financiamiento parcial de la Tesis de Doctorado otorgado por la Dirección de Postgrado y Postítulo de la Universidad de Chile PG 112/02.

2002 Beca CONICYT para estudiantes de Doctorado.

PREMIOS

2003 Premio al Mejor Trabajo de Investigador Joven, Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo.

FINANCIAMIENTO

Proyecto FONDECYT 1020581 (Dr. Hernán Lara).

Proyecto FONDECYT 1050765 (Dr. Hernán Lara).

Beca CONICYT para estudiantes de Doctorado (Monika Greiner).

Beca de apoyo realización de Tesis Doctoral CONICYT (Monika Greiner)

Beca de financiamiento parcial de la Tesis de Doctorado otorgado por la Dirección de Postgrado y Postítulo de la Universidad de Chile PG 112/02 (Monika Greiner).

Beca de financiamiento parcial de término de Tesis de Doctorado otorgado por la Dirección de Postgrado y Postítulo de la Universidad de Chile PG 63/2004 (Monika Greiner).

*Science is a great game.
It is inspiring and refreshing.
The playing field is the universe itself.*

Isidor Isaac Rabi (1898-1988)

Premio Nobel en Física 1944

A mis compañeras de aventura

AGRADECIMIENTOS

Mis más sincera gratitud al Dr. Hernán Lara por sus enseñanzas y la gratificante oportunidad de trabajar en su laboratorio. He sido muy feliz ahí.

Al Dr. Alfonso Paredes por su generoso aporte en el trabajo experimental y su apreciada amistad.

Al Dr. Artur Mayerhofer por su interés y valiosa ayuda en parte fundamental de esta tesis, además de la invaluable oportunidad de usar la infraestructura de su laboratorio.

A Ubaldo Quiroz, David Neira y Mauricio Dorfman por su especial ayuda con algunos experimentos.

A Donald Brown y Leticia Luna por su amable colaboración con las técnicas de inmunohistoquímica.

Al Dr. Juan Führer y al equipo médico del Hospital San José por las muestras humanas usadas al comienzo de este proyecto.

Al Profesor Igor Lemus por su ayuda en la obtención de los fármacos utilizados.

- Figura 1:** Manifestación del Síndrome de Ovario Poliquístico a diferentes edades; **2**
- Figura 2:** Esquema de la activación del componente nervioso intrínseco en ovario por administración de valerato de estradiol; **12**
- Figura 3:** Efecto de la administración de valerato de estradiol en la morfología y ciclicidad ovárica; **27**
- Figura 4:** Curvas de calibración para la amplificación de los respectivos transcritos para β -actina, NGF y p75NTR mediante PCR semicuantitativo; **28**
- Figura 5:** Concentración de mRNA para NGF; **29**
- Figura 6:** Concentración de NGF; **30**
- Figura 7:** Concentración de mRNA para p75NTR; **31**
- Figura 8:** Concentración de NE; **32**
- Figura 9:** Contenido de NE; **33**
- Figura 10:** Curvas de calibración para amplificación de mRNA para Tirosina Hidroxilasa mediante PCR en Tiempo Real; **35**
- Figura 11:** Concentración de mRNA para TH, **36**
- Figura 12:** Inmunohistoquímica para TH en las diferentes series experimentales; **37**
- Figura 13:** Inmunohistoquímica para NET en animales control; **38**
- Figura 14:** Curvas de calibración para amplificación de mRNA para transportador de Dopamina mediante PCR en Tiempo Real, **39**
- Figura 15:** Contenido de mRNA para DAT, **40**
- Figura 16:** Inmunohistoquímica para DAT en ovarios control, **41**

- Figura 17:** Inmunohistoquímica para DAT en series experimentales; **42**
- Figura 18:** Porcentaje de liberación fraccional de ^3HNE recién incorporada, **44**
- Figura 19:** Incorporación de ^3HNE en el tejido ovárico; **45**
- Figura 20:** Incorporación de ^3HNE en tejido ovárico en presencia de Cocaína, **46**
- Figura 21:** Porcentaje de liberación fraccional de ^3HNE recién incorporada en granulosa en animales control; **47**
- Figura 22:** Activación del sistema nervioso ovárico intrínseco, **69**
- Figura 23:** Modelo propuesto del mecanismo de hiperactivación nerviosa en la condición de ovario poliquístico; **70**

La activación del sistema nervioso simpático ha sido reconocida como uno de los factores que forman parte de la etiología del síndrome de ovario poliquístico (SOP) en humanos y en modelo de rata. La literatura muestra datos consistentes que relacionan el aumento de la actividad simpática, expresada en un aumento en la liberación de norepinefrina (NE) en ratas y en las prolongaciones nerviosas en humanos, y la formación de quistes ováricos. Así mismo, la simpatectomía en animales y la resección de la zona de entrada de los nervios ováricos en humano, permiten una vuelta a la ciclicidad estral y menstrual respectivamente. Datos clínicos apuntan, además, a que la condición poliquística sería persistente, ya que las mujeres con SOP durante el embarazo y el postparto presentan patrones hormonales alterados con respecto a las mujeres control, a pesar de existir un bloqueo central del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Esto indica que existe también un componente intraovárico que participa en la mantención de esta condición.

En modelo animal, durante el establecimiento de la condición quística, se ha observado un aumento conjunto en el mRNA para el factor de crecimiento neuronal (NGF) y en el de su receptor de baja afinidad p75NTR. Se sabe que la sobreexpresión de esta neurotrofina gatilla la activación nerviosa y además genera quistes ováricos y que la utilización de anticuerpos anti-NGF, permite una vuelta a la normalidad.

En el ovario se han descrito diferentes tipos celulares que podrían participar junto con la innervación extrínseca en la homeostasis de las catecolaminas ováricas. Estos serían la contraparte ovárica intrínseca que participaría, en respuesta a cambios en el complejo neurotrófico NGF/p75NTR, junto con la innervación extrínseca, en la hiperactividad nerviosa persistente, característica de la condición poliquística.

Para resolver esta hipótesis usamos un modelo de ovario poliquístico generado en ratas, 60 días post administración de una dosis única de valerato de estradiol. Se desarrolla así una condición quística en los ovarios de los animales con características similares a las humanas. En este modelo observamos aumento en el mRNA para p75NTR y con esto una mayor disponibilidad de NGF para su acción sobre las células blanco. Esto podría explicar una activación tanto del componente nervioso extrínseco como intrínseco. Mediante RT-PCR en tiempo real medimos la concentración de mRNA para Tirosina hidroxilasa, marcador de la presencia de cuerpos neuronales, corroborando la presencia éstas. Sin embargo al no haber cambios en la concentración del mRNA entre la condición control y la condición quística, creemos que las neuronas no participan de manera activa durante la condición quística. Usando inmunohistoquímica observamos la presencia del transportador de Dopamina (DAT) en células de granulosa, células intersticiales y cuerpos lúteos tanto en la condición quística como en la control y creemos que este transportador es un buen marcador de algunas de las células del componente nervioso ovárico intrínseco. Para evaluar la funcionalidad del sistema nervioso extrínseco e intrínseco, se midió la capacidad de liberación del trazador radiactivo norepinefrina tritiada (^3HNE). Observamos una mayor capacidad de liberación de ^3HNE en los animales con quistes y al desnervar, esta liberación disminuye sólo a niveles control, indicando, desde un punto de vista fisiológico, la participación de un componente celular intraovárico. La incorporación de ^3HNE es un indicador de la presencia de estructuras nerviosas. En la condición quística la incorporación es mayor que en la situación control y cuando se desnerva al animal con quistes, la incorporación no varía, indicando que el componente intraovárico está activado en la condición quística. Al bloquear la incorporación de ^3HNE con cocaína, los animales con quistes y desnervación, incorporan menos que los animales con

quistes, indicando que la incorporación de NE en los animales con quistes, estaría mediada probablemente por DAT.

Los resultados presentados muestran evidencias fuertes sobre la existencia de un sistema nervioso ovárico intrínseco, el que participaría junto con el sistema nervioso extrínseco en el control de los niveles de catecolaminas intraováricas. Además la activación de este componente intraovárico, dada por cambios en el complejo neurotrófico, podría explicar la mantención de la hiperactividad nerviosa característica de esta condición.

ABSTRACT

An increased activity of the sympathetic neuronal system has been proven to be one of the factors taking part of the etiology of the Polycystic Ovary Syndrome (PCOS), both in human and rat models. Literature shows consistent data relating the increase in sympathetic activity, expressed by a higher release of norepinephrine (NE) in rats, by increased neuronal projections in humans, and the build-up of ovarian cysts. In the same line, sympathectomy in animals and surgical resection of the ovarian neuronal input in humans, allow a recovery of the estrual and menstrual ovulatory cyclicity respectively. Clinical data suggests, that the polycystic condition would be persistent, given that PCOS women show altered hormonal patterns during pregnancy and post-delivery times, in relation to control women, despite that during pregnancy there is a suppression of the hypothalamic pituitary axis. The last evidence indicates that there is an intra-ovarian component participating in keeping the condition up.

During development of cystic condition in rat, it has been possible to establish a concomitant increase of the mRNA for nerve growth factor (NGF) and its respective low affinity receptor, p75NTR. The over-expression of this neurotrophin triggers the neuronal activation, generating ovarian cysts. The use of antibodies anti-NGF, allows the turn-back to a normal condition. Different cell types have been described in the ovary that could be part of the homeostatic changes in ovarian catecholamines, being these intra-ovarian counterparts an active component in the neuronal hyperactivity, typical of the polycystic condition.

To solve this hypothesis we used a rat polycystic model, generated after 60 days of administration of a single injection of estradiol valerate, developing a PCO condition with similar characteristics to that of humans. In this model we found an increase in mRNA_{p75NTR} and hence in the availability of NGF to act on cells. That could explain an activation of both the external and the internal

neuronal component. Through real time RT-PCR, we measured the concentration of mRNA for Tyrosine Hydroxylase (TH), a marker for neuronal cell bodies that could be used to measure changes in intraovarian nerve cell. There were no changes in the concentration of THmRNA among control and EV-treated rats, thus we believe that catecholaminergic neurons do not participate actively during the cystic condition.

Using immunohistochemistry techniques, we found the Dopamine transporter (DAT), located in granulosa cells, interstitial cells and corpora lutea, both in cystic and control condition. Therefore it could be a good tracer of the intra-ovarian neuronal component. Using the radioactive tracer ^3HNE , we found a higher NE release in the ovary of animals with cysts, but among those denervated; the release was reduced but only up to no-denervated control rats, indicating an active role of an intra-ovarian cellular component. Another marker for the presence of neuronal structures is the incorporation of ^3HNE . In the cystic condition, this incorporation is higher than in the control condition, but after denervation of EV-treated rats, we found that there is no difference with the EV-treated rat, indicating that the intra-ovarian component was activated in the cystic condition. By blocking the incorporation of norepinephrine using cocaine, cystic-denervated animals incorporate less ^3HNE than the cystic animals, indicating that the incorporation of NE in cystic animals could be probably mediated by DAT.

Altogether the results, present strong evidence for the presence of an intrinsic neuronal system in the ovary and its participation in the control of intraovarian levels of catecholamines. The activation of this component through a neurotrophic-mediated mechanism, could explain the maintenance of the neuronal hyperactivity characteristically seen in PCO.

GLOSARIO

°C	grados centígrados	N	normal
µg	microgramo	NE	norepinefrina
µl	microlitro	ng	nanogramo
µm	micrometro	NGF	factor de crecimiento nervioso
³ HNE	norepinefrina tritiada	nm	nanometros
cDNA	DNA complementario	nM	nanomolar
Ci/mmol	curie/milimol, actividad específica	ns	no significativo
D.O.	densidad óptica	pb	pares de bases
DAB	diaminobencidina	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
DNA	ácido desoxirribonucleico	pg	picogramo
dNTPs	mezcla de nucleótidos	RNA	ácido ribonucleico
dpm	desintegraciones por minuto	RNAsin	inhibidor de RNAsas
DTT	ditiotreitól	RT-PCR	transcripción reversa asociada a PCR
EDTA	etilen diamino tatraacético	seg	segundos
g	fuerza de gravedad	V	volts
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución	v/v	porcentaje volumen/volumen
hrs	horas		
Hz	hertz		
IgG	inmunoglobulina G		
kg	kilogramos		
mAb	anticuerpo monoclonal		
mg	miligramos		
min	minutos		
ml	mililitro		
mm	milímetros		
mM	milimolar		
mRNA	ácido ribonucleico mensajero		
mseg	milisegundo		
mV	milivolts		

1. INTRODUCCIÓN

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es un desorden heterogéneo que afecta al 5%-10% de las mujeres en edad fértil (Norman, Wu y Stankiewicz 2004; Tsilchorozidou, Overton y Conway 2004), siendo la principal causa de infertilidad de origen ovárico (Vaitukaitis 1983). Fue descrito en el año 1935 por Stein y Leventhal como una patología que se caracteriza por la presencia de amenorrea, infertilidad, hirsutismo y ovarios de mayor tamaño con la presencia de numerosos quistes foliculares. Actualmente se le reconoce como parte del síndrome metabólico el que puede incluir hiperinsulinemia, hiperlipidemia, diabetes mellitus tipo II y riesgo cardiovascular. El SOP se asocia también con un aumento en los niveles de andrógenos, hirsutismo, anovulación, infertilidad, aumento de cáncer endometrial y obesidad (Lobo y Carmina 2000; Ibáñez y cols. 2002; Norman 2002). De acuerdo al criterio adoptado en el *PCOS Consensus Workshop* patrocinado por la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología y la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva en el año 2003 en Rotterdam-Holanda, el SOP es diagnosticado si es que al menos se cumplen dos de los siguientes requisitos:

1. presencia de ovarios poliquísticos mediante examen con ultrasonido
2. hiperandrogenismo clínico o bioquímico
3. disfunción menstrual con anovulación.

Además deben excluirse otras patologías como: hiperplasia adrenal congénita, tumores secretores de andrógenos y Síndrome de Cushing.

Según los estudios actuales, muchas de las características patológicas asociadas con SOP se manifiestan a distintas edades, que varían desde la vida *in utero*, la niñez, la peripubertad, la adolescencia, la adultez temprana y edad reproductiva, hasta el envejecimiento (Figura 1) (Norman, Wu y Stankiewicz 2004). Teniendo en consideración el amplio espectro de edades en que este desorden se presenta y las diferentes manifestaciones fisiológicas del mismo, el

estudio de esta patología no debiese remitirse tan sólo a la edad reproductiva, sino que abarcar el amplio espectro etario. Esto en conjunto con el entendimiento de las bases moleculares y fisiológicas de la patología permitirá una pesquisa precoz y un tratamiento integral.

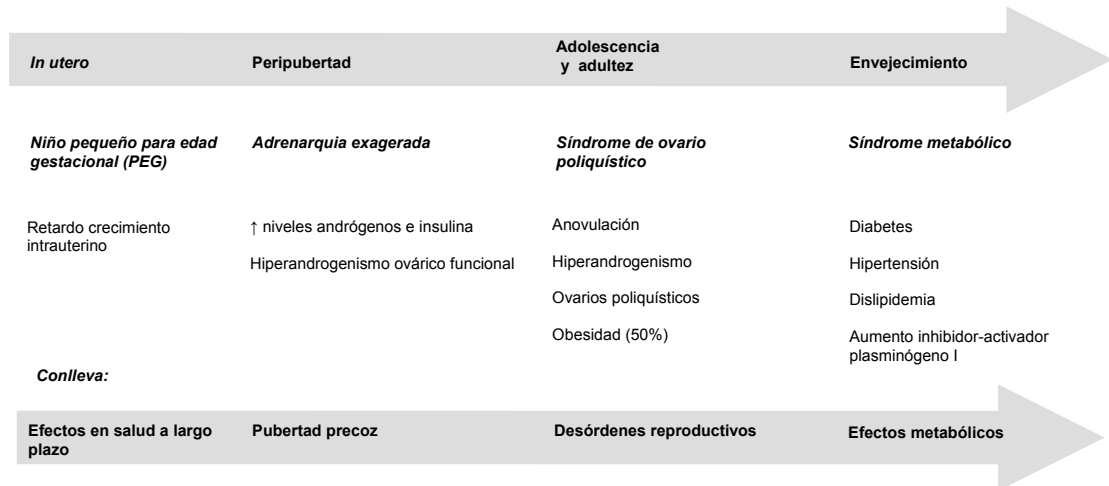


Figura 1: Manifestación del Síndrome de Ovario Poliquístico a diferentes edades.

Adaptado de Norman, Wu y Stankiewicz 2004.

1.1 Regulación nerviosa extrínseca de la función ovárica

Con respecto a la patogénesis del SOP, no existen criterios consensuados (Tsilchorozidou, Overton y Conway 2004). La heterogeneidad de este síndrome puede deberse a variados mecanismos patofisiológicos involucrados, entre los que se señalan los de tipo endocrino y los que tienen relación con la participación del sistema nervioso autonómico.

La participación del componente endocrino en la condición de Ovario Poliquístico ha sido ampliamente estudiada (Yen 1999; Sheehan 2004; Ehrmann 2005) y en nuestro laboratorio se ha dado énfasis al estudio del componente nervioso en esta patología.

El control nervioso ovárico ha sido considerado como uno de los mecanismos finos de control de la función gonadal normal y junto con la acción del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, regulan por completo la función

reproductiva (Gerendai, Banczerowski y Halász 2005). El ovario está innervado extrínsecamente por las proyecciones de las vías nerviosas simpáticas y sensoriales. Las vías nerviosas simpáticas están compuestas por neuronas que contienen norepinefrina (NE) y neuropéptido-Y (NPY) y las vías sensoriales por fibras que contienen sustancia P (SP) y péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP). Ambos tipos de vías nerviosas contienen, además, VIP (Lawrence y Burden 1980; Klein y Burden 1988). La innervación extrínseca posee dos rutas de entrada: el plexo nervioso y el nervio ovárico superior (SON). El plexo nervioso viaja junto a los vasos sanguíneos, lleva la mayoría de las fibras sensoriales, los nervios con NPY y el grueso de la innervación noradrenérgica que controla la vasculatura (Baljet y Drukker 1979; Lawrence y Burden 1980; Dees y cols. 1986; McDonald y cols. 1987). El SON está asociado al ligamento suspensorio y compromete la mayoría de las fibras noradrenérgicas que innervan los folículos y toda la innervación VIPérgica de la glándula (Ahmed y cols. 1986; Klein y Burden 1988).

La innervación ovárica se establece inicialmente con estructuras foliculares tempranas y se mantiene en el tiempo, acompañando a los folículos durante todo el proceso de maduración. Una vez que ocurre la ovulación, la innervación simpática continúa asociada a las células tecales de los folículos se mantiene, aunque éstas se transforman en células intersticiales secundarias, las cuales mantienen la capacidad de sintetizar andrógenos ováricos. El que la innervación simpática se establezca en periodos tempranos del desarrollo folicular y acompañe a los folículos durante el proceso de maduración, se relaciona muy bien con las funciones que han sido descritas para ésta, como son la de regular el flujo sanguíneo dentro de la glándula y contribuir al control de la síntesis de andrógenos ováricos (Hernández y cols. 1988). Los nervios ováricos parecen poseer un alto grado de plasticidad, ya que reinervan la glándula después de ser transplantada a un sitio ectópico (Lara y cols. 1991b) y, al menos en primates, se desarrollan rápidamente a medida que el animal alcanza la

pubertad (Schultea, Dees y Ojeda 1992). Estas observaciones han sugerido que, además de un efecto estimulante sobre la esteroidogénesis, los nervios ováricos deben ejercer un efecto positivo en el crecimiento folicular (Schultea, Dees y Ojeda 1992). Un fuerte apoyo a este concepto está dado por experimentos en los cuales la pérdida permanente de la inervación simpática, causada por inmunosimpatectomía neonatal pasiva o activa, lleva a un desarrollo folicular retardado, una respuesta a gonadotrofinas disminuida y marcadas irregularidades en el ciclo estral (Lara y cols. 1990a; Lara y cols 1990b; Lara, McDonald y Ojeda 1990c).

El hecho que mujeres con SOP presenten una producción exagerada de andrógenos y que en situaciones de normalidad existan etapas del desarrollo folicular que son controladas por la actividad nerviosa autonómica, fomentó el estudio de factores no endocrinos, que regulen estos procesos de la función ovárica y puedan participar en la patología. En el Laboratorio de Neurobioquímica (U. de Chile) se ha fundamentado experimentalmente la hipótesis de que una disfunción del Sistema Nervioso Autonómico puede actuar como agente etiológico en el desarrollo del SOP (Lara y cols. 1993; Barría y cols. 1993); una hipótesis que actualmente ha sido incorporada a textos de la especialidad (Yen 1999), abriendo un nuevo campo de estudio para esta patología.

1.2 Participación de factores neurotróficos en la función ovárica

En el ovario, la sobrevivencia de las neuronas simpáticas es dependiente de la presencia del factor de crecimiento neuronal (NGF) que es producido por las células de la teca (blanco de la inervación). El establecimiento y mantención de la inervación simpática ovárica depende de la disponibilidad del mismo (Lara y cols. 1990a). En el ovario, el NGF ejerce sus efectos a través de dos tipos de receptores de membrana. Uno es un receptor de baja afinidad, llamado p75NTR, que presenta, además, afinidad por toda la familia de las

neurotrofinas. El otro es un receptor de alta afinidad, asociado a actividad tirosina kinasa, llamado TrkA (Chao y Hampstead 1995).

Existen variadas situaciones experimentales que dan cuenta de la participación del NGF en el desarrollo normal de la función ovárica. Es así que se ha observado la expresión de mRNA y proteína NGF en ovario inmaduro de rata (Lara y cols. 1990a). Por su parte, la aplicación de anticuerpos anti-NGF a ratas neonatas, provoca un bloqueo en el desarrollo de la inervación simpática y junto con ello, detención en el crecimiento folicular, viéndose disminuida además la producción de andrógenos y estradiol. Además el comienzo de la ovulación se retrasa, la ciclicidad estral se pierde y hay compromiso de la fertilidad (Lara y cols. 1990a). Estos resultados son indicativos, del papel que juega la inervación simpática en el desarrollo normal de la función ovárica y de la estrecha relación con la presencia de NGF en el ovario. Los datos anteriores son consistentes en demostrar la relación entre el NGF y el desarrollo normal de la función ovárica en modelos animales. Probablemente esta acción tenga relación directa con la capacidad del NGF de fomentar la supervivencia neuronal.

1.3 Regulación neuroendocrina en la condición quística

Con el fin de estudiar los mecanismos neuroendocrinos involucrados en la generación y mantención de SOP, se han desarrollado modelos experimentales que remedan las características de esta patología. Lamentablemente el mono Rhesus no desarrolla SOP en forma espontánea, de forma que el estudio de SOP en primates ha sido limitado. Una forma de SOP se consigue al inyectar ratas con una dosis única de valerato de estradiol, un estrógeno de vida media larga. Las ratas tratadas pierden la ciclicidad estral, presentan quistes foliculares, aumento en la actividad noradrenérgica y en la producción de andrógenos ováricos. Aparentemente estos cambios serían de origen neurogénico, ya que ambas situaciones se revierten al realizar una simpatectomía parcial del ovario (Barría y cols. 1993; Lara y cols. 1993).

En apoyo a esto, el aumento en el tono simpático provocado por estrés de frío e

inmovilización, provoca un importante retraso en el desarrollo folicular (Paredes y cols. 1998; Gálvez y cols. 1999; Dorfman y cols. 2003). Por su parte, al remedar la acción de la norepinefrina (NE) con un agonista β -adrenérgico, se observa la aparición de quistes ováricos y cambios en la secreción de esteroides ováricos (Lara y cols. 2002). Estos resultados experimentales en modelo de rata, apoyan fuertemente la participación del sistema nervioso extrínseco en el desarrollo y mantención de los quistes ováricos semejantes a los que presentan mujeres con SOP.

En ovarios de mujeres con esta patología, se han observado variaciones con respecto a la inervación simpática. Ya en el año 1969, Semenova (1969) describió un cambio en la inervación adrenérgica en los ovarios de este tipo de pacientes, observándose una profusión de fibras adrenérgicas. Actualmente se ha encontrado también, asociado al aumento en la densidad de fibras nerviosas en ovarios SOP, una disminución en el número de mastocitos (Heider, Pedal y Spanel-Borowski 2001). Estos hallazgos podrían indicar una alteración en el tono adrenérgico y en la comunicación neuroinmune que se establece en el ovario y que puede ser de gran relevancia en ovarios poliquísticos.

En el modelo de ovario poliquístico generado por esteroides en ratas, junto con un aumento en la actividad adrenérgica, hay un incremento en la producción de NGF y este aumento tiene directa relación con la formación de quistes (Lara y cols. 2000). El aumento en la síntesis de NGF y de su receptor p75NTR, se ve acompañado por una activación selectiva de las neuronas noradrenérgicas que proyectan hacia el ovario. Por otra parte el uso de anticuerpos anti-NGF y oligonucleótidos antisentido contra p75NTR, permiten la reaparición de la ovulación y la ciclicidad estral. En los aspectos morfológicos hay una recuperación en el número de folículos antrales por ovario y una disminución significativa en los folículos prequísticos y quísticos. (Lara y cols. 2000). Esto es indicativo de que el NGF forma parte de las alteraciones bioquímicas y celulares que dan cuenta de la generación de quistes ováricos.

Con la finalidad de observar los efectos directos del exceso de NGF en la generación y/o mantención del ovario poliquístico, Dissen y cols (2000b), desarrollaron experimentos de sobreproducción local de NGF mediante el implante intraovárico de células sobreproductoras de NGF en ratas, de manera de remedar los resultados obtenidos con valerato de estradiol, en relación con la formación de quistes ováricos. Mediante el uso de estos implantes, se observaron cambios en la morfología ovárica consistentes con los observados después de la administración de valerato de estradiol. El contenido de NGF en los ovarios tratados fue dos veces mayor que en ovarios controles y provocó un aumento en los niveles de androstenediona sérica, la ciclicidad estral fue interrumpida y se observó un aumento de folículos prequísticos, junto con una disminución en el número de folículos antrales sanos. Estos resultados muestran que un aumento de los niveles de NGF, además de favorecer la síntesis de andrógenos ováricos, está asociado con cambios en la morfología ovárica acordes con un proceso de desarrollo de quistes foliculares.

1.4 Sistema nervioso ovárico intrínseco

De manera conjunta a la inervación simpática clásica, se ha descrito la presencia de células intraováricas que podrían participar paralelamente en la homeostasis catecolaminérgica del ovario, regulando así su función.

En ovario de algunas especies de mamíferos como mono Rhesus (Dees y cols. 1995) y rata Wistar (D'Albora, Lombide y Ojeda 2000), se ha observado la presencia de estructuras celulares con características morfológicas y moleculares similares a las que presentan los cuerpos neuronales, siendo independientes de la inervación simpática o extrínseca descrita anteriormente.

Esta población de cuerpos neuronales se ha observado también en ovarios humanos fetales y de primer año de desarrollo postnatal (Anesetti y cols. 2001). Las células son en un 20% de tipo catecolaminérgicas, presentan inmunorreactividad para neurofilamentos en el hilum y la médula y la mayoría

coexpresa el receptor de baja afinidad para neurotrofinas (p75NTR). Las características señaladas anteriormente también están presentes en las neuronas del ovario de mono. Hasta el momento, estas estructuras neuronales, no se han descrito en ovarios humanos adultos, pero la presencia de éstas en ovario humano perinatal, en primates y ratas, tanto jóvenes como adultas, plantea la posibilidad de la presencia de las mismas en humanos en edad reproductiva.

Además de las neuronas intraováricas, se ha establecido claramente la presencia de células cromafines en ovario de rata, las que contienen catecolaminas primarias como dopamina (DA) y NE (Fortak, Kmiec y Wrutniak-Żołnowska 1979). Éstas células presentan variaciones en el contenido de gránulos cromafines y vacuolas, que tienen relación directa con los diferentes estados del ciclo estral (Wrutniak-Żołnowska 1980). En variadas especies de peces (Gupta, Thakur y Shrivastava 1974; Thakur 1975) la localización y posibles variaciones de tamaño de estas células durante el ciclo reproductivo, sugieren que participan en el crecimiento y maduración folicular, así como en la ovulación.

Otra fuente de catecolaminas intraováricas está dada por los ovocitos. En mono se ha observado que son capaces de sintetizar NE (Mayerhofer y cols 1998). Estos ovocitos no poseen ni mRNA ni proteína tirosina hidroxilasa (TH), indicando que son incapaces de sintetizar DA) sin embargo poseen el gen para el transportador de dopamina (DAT), el que presenta idéntica homología con el de cerebro humano. La existencia de este transportador sugiere que la internalización de DA por esta vía es la forma en que los ovocitos obtienen sustrato para la síntesis de NE (Mayerhofer y cols 1998).

Se plantea de esta manera la existencia de células que darían cuenta de un sistema nervioso intrínseco, que podría estar participando de manera activa junto con el sistema nervioso simpático extrínseco en el control de la función ovárica.

El que estas neuronas y/o elementos intraováricos catecolaminérgicos puedan participar en la fisiología ovárica ha sido sugerido recientemente por Lara (Lara y cols. 2002), ya que el ovario de rata desnervada por tratamiento crónico con guanetidina, recupera la inervación después del tratamiento con estradiol. Lo que supone la activación de las estructuras antes señaladas y su posible participación en la perpetuación de la condición de ovario poliquístico

El SOP en humanos es una patología que ha sido considerada como recurrente y hoy en día más bien como persistente, los datos clínicos que apoyan esta última idea tienen relación con el hecho de que las mujeres con SOP que se embarazan por inducción de ovulación, mantienen altos índices de andrógenos plasmáticos (Sir-Petermann y cols. 2002), a pesar de que en el embarazo existe un bloqueo central de la función ovárica. Por tanto deben existir factores **intraováricos** que favorecen la perpetuación del síndrome en el tiempo. La información recientemente obtenida en humanos, sumada a la proporcionada por los modelos experimentales de quistes ováricos en ratas por inyección de valerato de estradiol, estrés de frío y uso de agonistas β -adrenérgicos, permiten sugerir, que un exceso de actividad noradrenérgica, ya sea extrínseca o intrínseca en el ovario de pacientes con SOP, expresada en una elevada presencia de catecolaminas, puede estar dando cuenta, por un lado, del hiperandrogenismo característico del SOP y por otro, de la generación y mantención de esta condición poliquística.

Una activación simpática sobre los ovarios podría gatillar inicialmente un aumento en la producción de andrógenos y posteriormente, un aumento en los niveles de NGF intraováricos, junto con los de su receptor de baja afinidad p75NTR. Estos podrían:

- generar un incremento de la actividad noradrenérgica del nervio ovárico superior (inervación simpática extrínseca) y
- un aumento en la actividad de las células con características catecolaminérgicas propias del ovario (inervación intrínseca).

Este aumento sostenido de NE y quizás de otras catecolaminas, puede estar dando cuenta de la actividad esteroidogénica anormal presente en las células de la teca de pacientes con SOP.

Además, a pesar de que las células de este sistema de regulación intraovárico forman parte de un sistema independiente al de la inervación simpática extrínseca, podrían ser reguladas por éste o podrían activarse por efecto del estímulo central y acoplarse al aumento de actividad del sistema extrínseco. Se generaría así un mecanismo común que entregue las señales moleculares necesarias para favorecer la mantención de quistes ováricos.

Tomando en consideración:

- que la activación del sistema nervioso extrínseco participa en la condición de ovario poliquístico,
- que la condición SOP es persistente,
- que durante SOP se mantiene la condición hiperandrogénica y
- que en el ovario existe un complejo neurotrófico, se plantea la siguiente **hipótesis:**

“En el ovario de mamífero existe un sistema nervioso intrínseco funcional, que en respuesta a cambios neurotróficos se activa y junto con el sistema nervioso extrínseco, generan una condición de hiperactividad nerviosa que favorece la perpetuación de la condición de ovario poliquístico”

Para comprobar esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos, los que fueron evaluados en modelo de ovario poliquístico generado en ratas:

OBJETIVO 1

Establecer la existencia de cambios neurotróficos en la condición quística que favorezcan la activación del sistema nervioso ovárico intrínseco.

OBJETIVO 2

Caracterizar al sistema nervioso ovárico intrínseco mediante la búsqueda de un marcador molecular.

OBJETIVO 3

Establecer la participación del sistema nervioso ovárico intrínseco en la hiperactividad nerviosa característica de la condición quística.

En la figura 2 se esquematiza lo propuesto anteriormente.

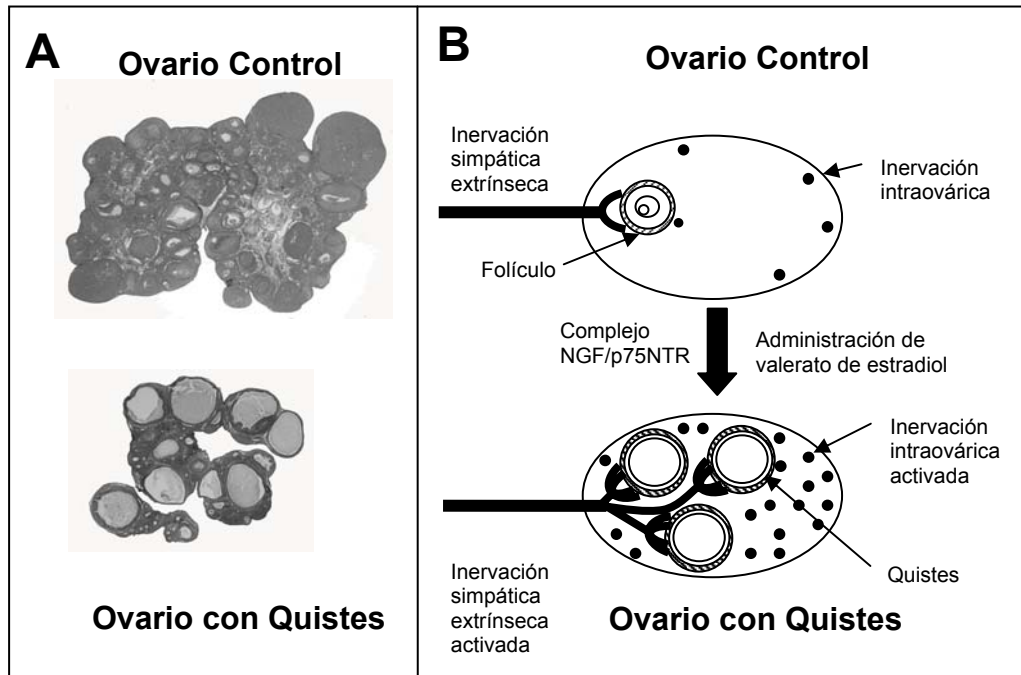


Figura 2: Esquema de la activación del componente nervioso intrínseco en ovario por administración de valerato de estradiol.

En **A** se observan fotografías de cortes de ovario control y de ovario con quistes por administración de valerato de estradiol. En **B** se esquematizan los cambios que sufre la inervación ovárica en la situación quística. El ovario está inervado por el sistema nervioso simpática extrínseco, el que inerva preferentemente los folículos ováricos y además posee células que tendrían la capacidad de participar en la homeostasis de las catecolaminas ováricas, Entre éstas se destacan neuronas, el ovocito y dependiendo de la especie: células cromafines. En esta tesis se postula la activación de algunos de estos tipos celulares en la condición quística, de manera que participen conjuntamente con la inervación simpática extrínseca en la homeostasis de la NE intraovárica. El posible mecanismo de activación podría estar dado por cambios en el equilibrio del complejo neurotrófico NGF/p75NTR, que permita la activación del componente nervioso externo y del interno, de manera de generar una hiperactividad nerviosa que favorezca la perpetuación de la condición poliquística.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 ANIMALES

2.1.1 Ratas Wistar

Se utilizaron ratas hembras vírgenes de la cepa Wistar (alrededor de 200grs) provenientes del Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Las ratas fueron mantenidas bajo condiciones controladas en un régimen de luz/oscuridad (12 horas luz y 12 horas oscuridad), temperatura (25°C), libre acceso a alimento (pellets para ratas, Champion) y agua potable.

Animales Desnervados (SONX): con el fin de aislar al ovario del componente simpático, se realizó una sección quirúrgica del nervio ovárico superior. Ésta se realizó mediante aproximación dorsal, en animales anestesiados con Ketamina (90mg/kg) y Xilazina (10mg/kg) bajo supervisión veterinaria. Los animales fueron mantenidos por 11-12 días, tiempo en el cual no existe reinervación ovárica simpática (Dissen y cols. 1994; Rosa e Silva y cols. 2003).

Animales con Quistes Ováricos (EV): para obtener animales con quistes ováricos que semejen algunas de las características de la condición quística en humanos, las ratas fueron inyectadas con una dosis intramuscular única de valerato de estradiol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) (2mg/animal) en vehículo oleoso (aceite de maíz) (Brawer y cols. 1978). Los ovarios de estos animales fueron analizados 60 días post inyección.

Animales con Quistes Ováricos y Desnervación (EV SONX): para evaluar el efecto de la falta del control simpático en ovarios con quistes, se realizó una sección quirúrgica del nervio ovárico superior a animales 60 días

después de la administración de valerato de estradiol, tal como se señala en la condición SONX (ver arriba). Los animales se mantienen por 11-12 días en esta condición y los ovarios son analizados.

2.1.2 Ratas Sprague-Dawley

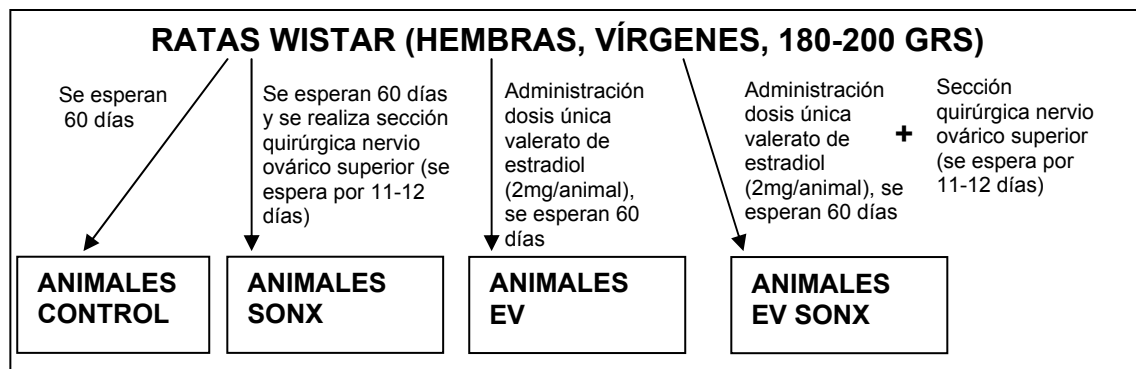
Se utilizaron ratas hembras vírgenes de 35 días de edad de la cepa Sprague-Dawley, provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Las ratas fueron mantenidas bajo condiciones controladas en un régimen de luz/oscuridad (12horas luz y 12horas oscuridad), temperatura (25°C), libre acceso a alimento (pellets para ratas, Champion) y agua potable. Estas ratas fueron utilizadas para la obtención de células de la granulosa.

Todos los procedimientos experimentales han sido aprobados por el comité de ética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

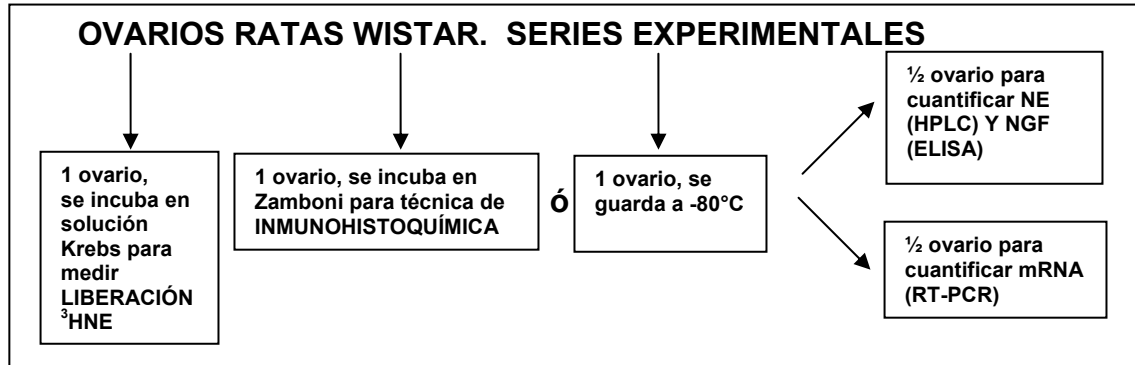
2.2 ESQUEMAS EXPERIMENTALES

2.2.1 Ratas Wistar

Esquema de generación de las series experimentales:

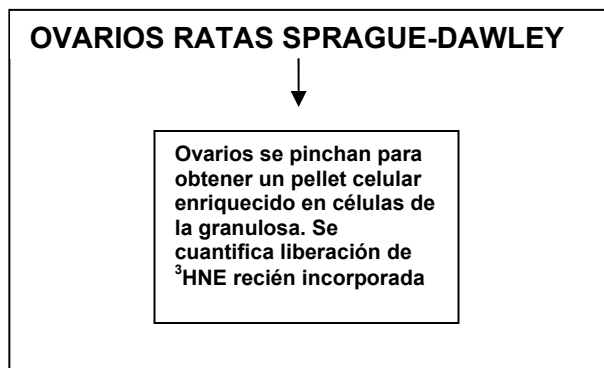


Esquema de uso de tejidos:



2.2.2 Ratas Sprague-Dawley

Esquema de uso de tejidos



2.3 INMUNOHISTOQUÍMICA

2.3.1 Fijación de los tejidos

Los ovarios fueron disecados y fijados en solución de Zamboni por 48hrs, 4°C; luego enjuagados en PBS por 24hrs, 4°C y Sacarosa 20% en PBS por 24 hrs., 4°C. Posteriormente se incluyeron en parafina, se cortaron en secciones de 6µm y se montaron sobre portaobjetos silanizados. Algunos ovarios, después del procedimiento de fijación, fueron almacenados a -80°C cubiertos con criopreservante (Microm Laborgeräte GmbH, Germany) hasta su imbibición en parafina.

2.3.2 Incubación con anticuerpos específicos

Las secciones de tejido fueron desparafinadas sucesivamente en una batería de xilol (100%, 2 veces, 5min cada vez), isopropanol (100%, 2 veces, 5min cada vez), isopropanol (96%, 80%, 70%, 5 min cada vez). Se bloqueó la actividad peroxidasa por 20min a temperatura ambiente con solución de metanol 9%, peróxido de hidrógeno 6,3% 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. Rabbit anti-rat Dopamine Transporter (DAT) (Alpha Diagnostic Intl. Inc. San Antonio, TX, USA, 1:500), mouse anti-rat Tyrosine Hydroxylase (TH) (DiaSorin, Stillwater, MN, USA, 1:500) y rabbit anti-rat Norepinephrine Transporter (NET) (Chemicon International, Inc; 1:250). Posteriormente se incubó con anticuerpo secundario específico (gamma globulina biotinilada anti-rabbit y anti-mouse; 1:250) (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.). En el caso de DAT, como control de especificidad, se incubaron secciones de tejido con el primer anticuerpo preabsorbido con el péptido DAT (Alpha Diagnostic Intl. Inc. San Antonio, TX, USA)

Las secciones fueron observadas mediante un microscopio de luz Zeiss Axioskop (Carl Zeiss, Jenna, Germany) y fotografiadas digitalmente (Nikon Coolpix 995).

2.4. MEDICIÓN DE CONTENIDO DE mRNA MEDIANTE RT-PCR SEMICUANTITATIVO Y EN TIEMPO REAL

Para la obtención de RNA total se utilizó la mitad de un ovario, la otra mitad se homogeneizó para cuantificar NGF y NE. El RNA fue aislado mediante la técnica descrita por Chomzycynski y Sacchi (1997) y se cuantificó midiendo absorbancia a 260nm, considerando la relación 1D.O. \approx 40 μ g/ μ l de RNA (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989). La pureza fue evaluada de acuerdo a la razón de absorbancia 260/280 y la integridad por geles de agarosa.

2.4.1 Reacción de la transcriptasa reversa (RT) para la obtención de DNA complementario (cDNA)

Para la obtención de cDNA se tomaron 5 μ g de RNA total por muestra y se incubaron en un régimen de 10min a 22°C, 60min a 37°C, 45min a 42°C y 10min a 96°C, con 1,6mM dNTPs, 10mM DTT, 176nM partidores hexámeros azarosos (Invitrogen, Carlsbad, CA), 25pmol RNAsin (Promega, Madison, Wis), 125U transcriptasa reversa SuperScriptII (Invitrogen, Carlsbad, CA), en buffer para transcripción reversa proporcionado por el proveedor, en un volumen final de 30 μ l.

2.4.2 Amplificación mRNAs de interés mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), procedimiento semicuantitativo.

Para analizar la presencia de mRNAs de interés se incubaron diluciones conocidas de cDNA con 3mM MgCl₂, 1mM dNTPs, 15pmol de cada partidore, 1U de DNA Taq polimerasa (Promega, Madison, Wis, USA), en un volumen final de 60 μ l. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador MJ Research PT-100 (MJ Research Inc., Watertown, MA) con un régimen de denaturación de 94°C por 1min, seguido de 21 (β -actina) y 35 (p75NTR y NGF) ciclos de apareamiento a 60°C (β -actina y NGF) y 63°C (p75NTR) por 1min y extensión a 72°C por 1min, finalmente 10min a 72°C. La secuencia de los partidores fue

previamente publicada (Yang y cols. 1995; Dissen y cols. 2000a; Greiner y cols. 2001). Para corroborar que las muestras de RNA no se encuentran contaminadas con DNA genómico, los partidores para β -actina fueron diseñados a partir de una secuencia codogénica que posee una sección intrónica, generando así un amplificado para mRNA de 315pb y para la secuencia genómica de 809pb. De manera paralela a la amplificación de los transcritos de interés y como control negativo de los procedimientos usados, en la reacción de transcripción reversa el RNA fue reemplazado por agua y en las reacciones de PCR, el cDNA fue reemplazado por agua o RNA. Los productos de RT-PCR fueron separados en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio (1mg/ml) al 0,033%v/v, en una solución de TBE (90mM Tris borato, 2mM EDTA) y posteriormente fotografiados (Películas Polapan 667, Polaroid, Cambridge, USA). Las imágenes fueron capturadas en un scanner (CanoScan FB330P, Canon Inc.) y la intensidad de las bandas fue cuantificada mediante el programa UN-SCAN-IT (versión 4.1 para Windows, Silk Scientific Inc., Orem, UT). Los resultados obtenidos fueron normalizados con respecto a la intensidad de la banda obtenida para el gen de expresión constitutiva β -actina.

2.4.3 Amplificación de mRNAs de interés mediante PCR en Tiempo Real

Se utilizó este procedimiento para la cuantificación del contenido de mRNA para TH, DAT y Ciclofilina en ovario de rata.

Para analizar el mRNA para TH la reacción se llevó a cabo en un termociclador Light Cycler (Roche Diagnostic), el producto amplificado fue detectado con SYBR Green, el que está incluido en la mezcla para PCR FastStar Master SYBR Green I mix (Roche Diagnostic). La reacción se realizó en un volumen de 20 μ l con 1,5mM de MgCl₂, 0,75 μ M de cada partidor y 1 μ l de cDNA. La secuencia de los partidores para tirosina hidroxilasa fue la siguiente: sentido 5' ggt-cta-ctg-tcc-gcc-cgt-gat-t 3' y antisentido 5' gag-ctt-gtc-ctt-ggc-gtc-att-g 3' Los

partidores fueron diseñados a partir de la secuencia para Tirosina hidroxilasa publicada en Genebank: número de acceso NM_12740.

La reacción de amplificación se llevó a cabo siguiendo el siguiente esquema: activación de Taq polimerasa a 95°C por 10min, 45 ciclos con denaturación a 95°C por 10seg, apareamiento a 60°C por 10seg, extensión a 72°C por 25seg. El producto de PCR fue cuantificado midiendo la fluorescencia dada por la unión del SYBR Green al producto de doble hebra en cada ciclo, inmediatamente después del proceso de extensión. Con el fin de comparar si el producto de PCR formado en cada una de las muestras ensayadas es el mismo, se realiza un proceso de desapareamiento de las dobles hebras generadas. Éste se lleva a cabo haciendo un barrido de temperatura entre 78 y 85°C y midiendo la fluorescencia a las distintas temperaturas. Las curvas de fluorescencia fueron analizadas con el programa Light Cycler, versión 3.5 (Roche Diagnostic).

Para mRNA DAT la reacción se llevó a cabo en un termociclador MJ Research PT-200 (MJ Research Inc., Watertown, MA, comprado a través de Proyecto Mecesup 0208 de Apoyo al Doctorado en Farmacología, Universidad de Chile) asociado a un detector de luminiscencia Chromo 4 (MJ Research Inc., Watertown, MA). El producto amplificado fue detectado con SYBR Green, el que en este caso estaba incluido en la mezcla para PCR Platinum SYBR Green PCR Super MIX UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA). La reacción se realizó en un volumen de 25µl con 2,4mM de MgCl₂, 0,16µM de cada partidor y 2µl de cDNA. La secuencia de los partidores para el transportador de dopamina fue la siguiente: sentido 5' acc-ttc-ttc-ccg-gag-cac-tgg 3' y antisentido 5' gca-ttt-aac-acc-ctg-gta-gca-cat 3'. Los partidores fueron diseñados a partir de la secuencia para DAT publicada en el GeneBank: número de acceso NM_012694. El esquema de amplificación es como sigue: activación de Taq polimerasa a 95°C por 10 min, 40 ciclos con: denaturación a 94°C por 15seg, apareamiento a 58°C

por 15seg, extensión a 72°C por 20seg. El producto de PCR fue cuantificado midiendo la fluorescencia dada por la unión del SYBR Green al producto de doble hebra en cada ciclo, inmediatamente después del proceso de extensión. La curva de despareamiento se realizó mediante un barrido de temperatura entre 78°C-85°C. Las curvas de fluorescencia fueron analizadas con el programa Opticon Monitor 2.3 (MJ Research Inc, Watertown, MA).

Con el fin de expresar el contenido de los mRNAs de interés con respecto a un mRNA de expresión constitutiva, se evaluó para cada caso el contenido de mRNA para ciclofilina. La secuencia de los partidores para ciclofilina se encuentra publicada en Dissen y cols 2000b.

Para las amplificaciones de mRNA ciclofilina realizadas en conjunto con las determinaciones de mRNA TH (equipo Light Cycler, Roche y PCR FastStar Master SYBR Green I mix), la muestra fue sometida a las siguientes condiciones: activación de Taq polimerasa a 95°C por 10min, 40 ciclos con: denaturación a 95°C por 10seg, apareamiento a 64°C por 10seg, extensión a 72°C por 25seg. Con el fin de comparar si el producto de PCR formado en cada una de las muestras ensayadas es el mismo, se realiza un proceso de despareamiento de las dobles hebras generadas. Éste se lleva a cabo haciendo un barrido de temperatura entre 78°C-85°C y midiendo la fluorescencia a las distintas temperaturas. Las curvas de fluorescencia fueron analizadas con el programa Light Cycler, versión 3.5 (Roche Diagnostic).

Para las determinaciones en conjunto con mRNA DAT (equipo MJ Research, Platinum SYBR Green PCR Super MIX UDG), la muestra fue sometida al siguiente régimen: activación de Taq polimerasa a 95°C por 10min, 37 ciclos con: denaturación a 94°C por 15 seg, apareamiento a 64°C por 15seg, extensión a 72°C por 20seg. El producto de PCR fue cuantificado midiendo la fluorescencia dada por la unión del SYBR Green al producto de doble hebra en

cada ciclo, inmediatamente después del proceso de extensión. La curva de desaparimiento se realizó mediante un barrido de temperatura entre 78°C-85°C. Las curvas de fluorescencia fueron analizadas con el programa Opticon Monitor 2.3 (MJ Research Inc, Watertown, MA).

En ambos casos el volumen de cDNA ciclofilina analizado fue de 1µl. Cada ensayo fue realizado usando controles positivos y negativos (cDNA de glándula adrenal y agua destilada, respectivamente) y en condiciones de esterilidad para prevenir falsos positivos.

2.5 CUANTIFICACIÓN DE NGF

Como se mencionó anteriormente, los ovarios de interés fueron partidos por la mitad y se utilizó una mitad para la obtención de RNA total y la otra mitad para la medición de NGF y NE. Estos procedimientos se realizaron de manera simultánea. La mitad utilizada para la medición de NGF y NE fue pesada y homogeneizada manualmente con un homogenizador vidrio/vidrio en hielo, en una relación 1:4 con tampón fosfato Dulbecco (DPBS, pH 7,35).

Para la medición de NGF se separó $\frac{1}{3}$ del volumen homogeneizado, se centrifugó a 13414xg por 15min a 4°C, el sobrenadante se diluyó 1:10 en DPBS y se guardó a -80°C hasta su uso. El NGF fue cuantificado mediante el kit comercial NGF E_{-max}[®] ImmunoAssay System (Promega Corporation, Madison, WI). Cada placa de 96 pocillos para ELISA se cubrió durante la noche con primer anticuerpo policlonal para NGF (pAb; 1:6250; 100µl por pocillo) en buffer carbonato (0,05M bicarbonato/carbonato de sodio, pH 9,7). Al día siguiente se removió el contenido de los pocillos y la placa fue lavada con tampón Tris-salino con Tween (TBST; 20mM Tris-HCl, pH7,6; 150mM NaCl; 0,05% v/v Tween[®]20). Posteriormente se incubó por 1hr a temperatura ambiente con *block and sample buffer* (1:4; 200µl por pocillo). Dos columnas en la placa de ELISA se destinaron para la curva estándar de NGF según las indicaciones del fabricante. Las

concentraciones finales del estándar en cada pocillo fluctuaron entre 0-500pg/ml.

Se tomaron alícuotas de 200µl de muestra, se agregaron a los pocillos y se realizaron dos diluciones sucesivas. La placa se incubó por 6hrs a temperatura ambiente bajo agitación constante, posteriormente se agregó el segundo anticuerpo monoclonal anti-NGF (mAb 1:4000; 100µl por pocillo) y se dejó por la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó con TBST y se agregó el tercer anticuerpo anti-rat IgG conjugado con Peroxidasa (1:100; 100µl por pocillo), se incubó por 2,5hrs bajo agitación a temperatura ambiente.

Posteriormente se agregó 100µl/pocillo de cromógeno TMB, se incubó por 10min a temperatura ambiente y con agitación. La reacción se detuvo al agregar 100µl/pocillo de HCl 1N. Se leyó absorbancia a 450nm en un lector de placas de ELISA.

2.6 CUANTIFICACIÓN DE NOREPINEFRINA MEDIANTE HPLC

A los $\frac{2}{3}$ de volumen restante de la homogeneización en tampón Dulbecco, se le agregó ácido perclórico 0,25N en relación 1:4 y se centrifugó a 7937xg por 3min a 4°C. El sobrenadante se guardó a -80°C hasta su uso.

Para llevar a cabo la cuantificación de NE, el sobrenadante se filtró en un filtro estéril de 0,22µm y se inyectaron 20µl en un HPLC (Waters P600, Milford, USA), el que posee una columna de fase reversa C18 (BAS MF 6213 ODS 3µm, West Lafayette, USA) y está asociado a un detector electroquímico (Waters 464, Milford, USA). La fase móvil contiene 100mM NaH₂PO₄, 1,29mM octil-sulfato, 0,02% EDTA y 0,5% acetonitrilo (pH 2,5) y fluyó a 1ml/min. Se utilizó un potencial de 650mV y una sensibilidad de 1nA en el detector amperométrico. Bajo estas condiciones de trabajo, el tiempo de retención para NE fue de 4min. Paralelamente se realizó una curva estándar con distintas concentraciones de NE entre 25-400pg.

2.7 LIBERACIÓN DE ³H-NOREPINEFRINA (³HNE) EN OVARIO *in vitro*

El procedimiento fue realizado de acuerdo a lo publicado anteriormente por nuestro laboratorio con algunas modificaciones (Ferruz y cols. 1991; Ferruz y cols. 1992; Lara y cols. 1993). Las ratas fueron sacrificadas por decapitación, se extrajeron los ovarios y uno de ellos se preincubó a 37°C por 10min en tampón Krebs-bicarbonato (pH 7,4) burbujeado constantemente con una mezcla de 95% O₂/5% CO₂. A continuación se incubó con 2µl/ml de ³HNE (levo-[2,5,6-³H]-norepinefrina, 52 Ci/mmol, NEN, Perkin Elmer Life Sciences, Inc), por 30min a 37°C. Posteriormente el exceso de ³HNE se eliminó con 6 lavados de 10min cada uno con tampón Krebs-bicarbonato. Los ovarios se transfirieron a una cámara de superfusión termorregulada y fueron bañados con Krebs-bicarbonato a un flujo constante de 1,5ml/min. Se colectaron fracciones de 1min, después de 3min el ovario fue sometido a una corriente de pulsos eléctricos monofásicos (80V, 10Hz, 10mseg/pulso por 1min) conducidos a través de un par de electrodos de platino y generados por un estimulador eléctrico Grass S-4 (Grass Instruments, Quince, MA). Se colectaron 4 fracciones posteriores. Después de este primer periodo de estimulación, los ovarios se incubaron con Krebs-bicarbonato más Tetraetilamonio (TEA, 10mM) por 10min a 1,5ml/min. El TEA es un bloqueador de canales de potasio que favorece la liberación de NE desde los terminales nerviosos en respuesta a la estimulación eléctrica (Wakade y cols. 1980). Los ovarios fueron sometidos a un segundo tren de estímulos en presencia de Krebs-bicarbonato-TEA. En cada ensayo de liberación, los ovarios de los animales de las diferentes condiciones experimentales fueron estimulados en paralelo con ovarios de animales control. Al término del experimento, para medir la radioactividad incorporada por el tejido, los ovarios fueron homogeneizados en ácido perclórico 0,4N y el contenido de ³HNE fue medido en un contador beta (Packard Liquid Scintillation Analyzer 1600TR; 72, 5% eficiencia para ³H). Para calcular la liberación de ³HNE desde los ovarios, se cuantificó de la manera anterior el contenido de radiactividad en

cada una de las fracciones colectadas. La liberación, que está representada por el flujo de ^3HNE desde los terminales nerviosos del ovario, se expresó como liberación fraccional, es decir, como porcentaje de la radiactividad presente en el tejido (Ferruz y cols. 1991; Ferruz y cols. 1992).

2.8 LIBERACIÓN DE $^3\text{H-NOREPINEFRINA}$ (^3HNE) EN OVARIO *in vitro* EN PRESENCIA DE COCAÍNA

Con el fin de comparar de manera más precisa el efecto de la presencia de cocaína en el medio, el ovario de rata fue partido en dos y una mitad se incubó con Krebs-bicarbonato y la otra con Krebs-bicarbonato más cocaína $10\mu\text{M}$ por 10min a 37°C . A continuación se incubó con $2\mu\text{l/ml}$ de ^3HNE (levo-[7,8- ^3H]-norepinefrina, 40 Ci/mmol, Amersham Biosciences, UK) por 30min a 37°C . Posteriormente el exceso de ^3HNE se eliminó con 6 lavados de 10min cada uno con tampón Krebs-bicarbonato. La mitad de ovario con cocaína fue lavada las 2 primeras veces con tampón Krebs-bicarbonato más cocaína $10\mu\text{M}$, con el objeto de evitar la recaptura de ^3HNE en el terminal nervioso. Los ovarios se incuban con Krebs-bicarbonato más Tetraetilamonio (TEA 10mM) por 10min a $1,5\text{ml/min}$ y se continuó el experimento como se señala anteriormente.

2.9 LIBERACIÓN DE $^3\text{H-NOREPINEFRINA}$ (^3HNE) EN CÉLULAS DE GRANULOSA *in vitro*

Con el fin de analizar la capacidad de liberación de NE por parte de las células de la granulosa, se procedió a aislarlas del resto de las estructuras ováricas. Para eso los ovarios fueron pinchados con una aguja sobre un pocillo de vidrio que contenía $50\mu\text{l}$ de Krebs-bicarbonato. Al pinchar el ovario aleatoriamente, se obtiene una suspensión celular enriquecida en granulosa. El procedimiento se repitió 2 veces y el volumen final se incubó por 10min a 37°C . La suspensión fue centrifugada a 3600xg por 6min y el sobrenadante fue desechado. Posteriormente se adicionaron $500\mu\text{l}$ de una solución $1\mu\text{l/ml}$ de

³HNE (levo-[7,8-³H]-norepinefrina, 40 Ci/mmol, Amersham Biosciences, UK) y se incubó por 30min a 37°C. Pasado el proceso de incubación, la suspensión de granulosa fue centrifugada a 3600xg por 6min y el sobrenadante fue guardado a 4°C hasta la cuantificación de la reactividad. El pellet celular fue resuspendido en 500µl Krebs-bicarbonato, incubado a 37°C por 10min y centrifugado a 3600xg por 6min de manera de arrastrar la radiactividad adsorbida. Este procedimiento se repitió 2 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 500µl de solución Krebs alta en potasio (80mM K). Se incubó por 10min a 37°C y se procedió a centrifugar como se señala anteriormente. Finalmente el pellet fue resuspendido en 500µl de Krebs normal. Se procedió igual que en los pasos anteriores y el pellet final fue resuspendido en 500µl de 0,4N ácido perclórico y se contó la radiactividad.

2.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados están expresados como valor promedio ± error estándar. Las diferencias entre los grupos experimentales se evaluaron usando el test *t* de Student, considerando $p < 0,05$ como significativo.

3.1 OBJETIVO 1

Establecer la existencia de cambios en el balance del complejo neurotrófico en la condición quística que favorezcan la activación del sistema nervioso ovárico intrínseco.

3.1.1 Morfología ovárica y ciclicidad estral en animales tratados con valerato de estradiol

Los animales adultos tratados con valerato de estradiol (Figura 3: B y D), al cabo de 60 días, presentan una morfología ovárica característica. Se observan quistes ováricos, inexistencia de cuerpos lúteos y un tamaño considerablemente menor comparado con un ovario de animal control (A y C), existe, además, pérdida de la ciclicidad estral (Brawer y cols. 1978). En el panel izquierdo de la figura 3 se puede comparar la ciclicidad de las ratas control con la situación acíclica de estro constante que presentan los animales con quistes. La determinación del metaestro se hizo difícil debido a que la duración en la rata es menor a 1 día, por lo que se decidió excluir este estado del ciclo estral en la figura 3.

3.1.2 Efecto del tratamiento con valerato de estradiol y la desnervación sobre la concentración de mRNA para NGF en el ovario

La determinación del contenido de mRNA para NGF y de otros transcritos de interés se realizó mediante RT-PCR semicuantitativo. Las curvas de calibración para la amplificación de cada transcrito se muestran en la figura 4. Los resultados de la figura 5 muestran que no existen cambios en la concentración de mRNA para NGF en los animales SONX ($1,1 \pm 0,1$; n: 7, ns) ni en los animales EV ($1,0 \pm 0,2$; n: 4; ns) con respecto al control ($1,0 \pm 0,1$; n: 9). Por el contrario en los animales EV SONX, existe un aumento estadísticamente

significativo de la concentración de este transcrito ($2,4 \pm 0,5$; n: 4; $p < 0,01$).

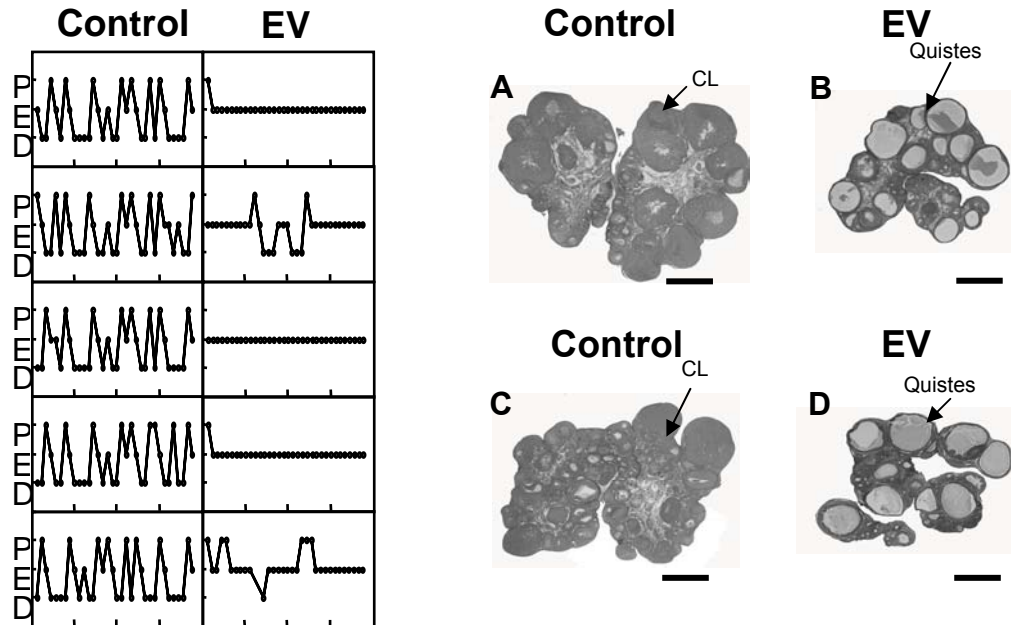


Figura 3: Efecto de la administración de valerato de estradiol (EV) en la morfología y ciclicidad ovárica.

En el panel de la izquierda se observan los patrones de ciclicidad de animales tratados con valerato de estradiol y animales control. Los animales EV presentan una pérdida de ciclicidad estral en comparación con los animales control, permaneciendo mayoritariamente en condición de estro (P: proestro, E:estro, D:diestro). En el panel de la derecha se observa la morfología de los ovarios control y los ovarios de animales tratados con valerato de estradiol. Estos últimos presentan abundantes quistes y disminución de tamaño. Se observa además la desaparición de cuerpos lúteos (CL), lo que se relaciona con la pérdida de ciclicidad estral y consiguiente anovulación. Barra: 1mm. (A y C: animales control; B y D: animales EV).

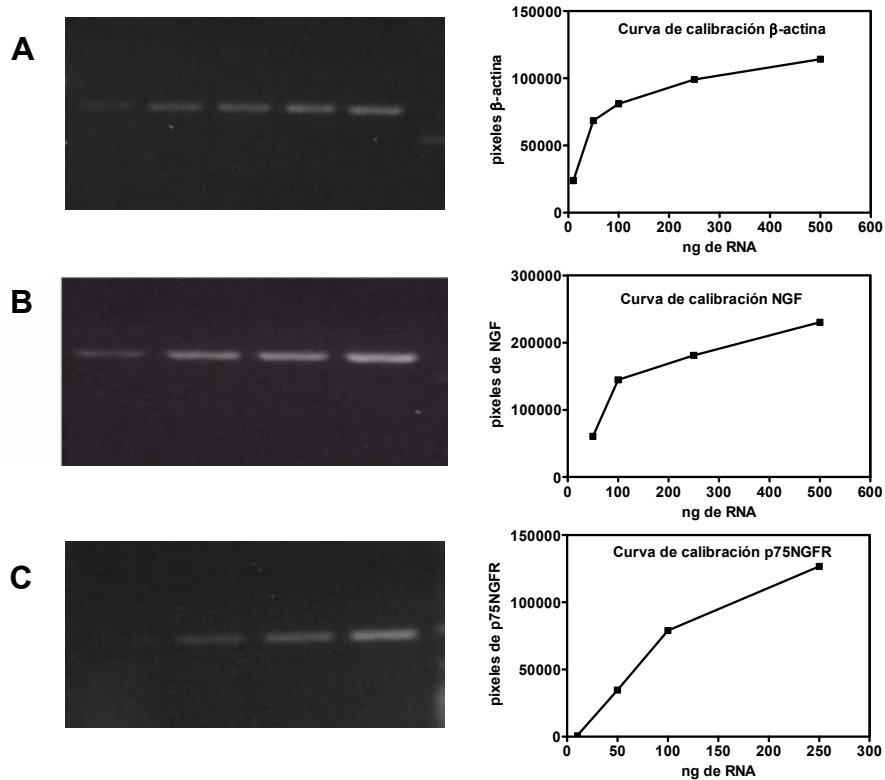


Figura 4: Curvas de calibración para la amplificación de los respectivos transcritos para β -actina, NGF y p75NTR mediante PCR semicuantitativo.

Al lado izquierdo se muestran las fotografías de geles representativos de las diferentes curvas de calibración y al lado derecho se muestran las gráficas obtenidas, expresadas en pixeles con respecto a la concentración de RNA agregado a la reacción.

A. La amplificación de β -actina se llevó a cabo bajo un régimen de 21 ciclos y temperatura de apareamiento de 60°C, el tamaño del fragmento es de 351pb. **B.** Para el transcrito para NGF la amplificación se realizó en 35 ciclos con una temperatura de apareamiento de 60°C, el tamaño del fragmento generado es de 461pb. **C.** La amplificación para p75NTR se realizó en 35 ciclos con una temperatura de apareamiento de 63°C y el producto de PCR amplificado corresponde a 247pb.

Para la amplificación de todos los transcritos, en cada una de las reacciones se tomaron 30ng de RNA iniciales. El análisis de los pixeles se obtuvo con el programa UN SCAN IT.

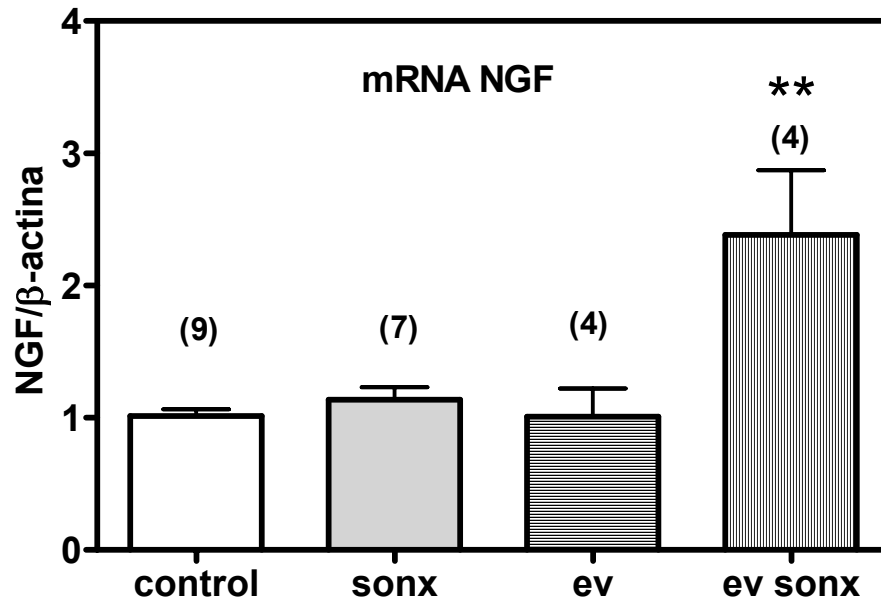


Figura 5: Concentración de mRNA para NGF.

La figura representa la concentración de mRNA para NGF en animales control ($1,0 \pm 0,1$) control desnervado (SONX) ($1,1 \pm 0,1$), con quistes (60 días post administración de dosis única de valerato de estradiol) (EV) ($1,0 \pm 0,2$) y con quistes desnervados (EV SONX) ($2,4 \pm 0,5$). La concentración de mRNA para NGF se expresa como el número de pixeles correspondientes a la banda del producto de PCR, obtenidos del gel de electroforesis, con respecto a los pixeles obtenidos para el gen de expresión constitutiva β -actina. Los datos son corregidos al asignar el valor 1 a la razón pixeles mRNA NGF/pixeles mRNA β -actina de los animales control. El valor absoluto para los controles fue de $1,4 \pm 0,3$ (pixeles NGF/pixeles β -actina \pm SEM). Las barras verticales representan el valor promedio \pm error estándar y los valores entre paréntesis corresponden al número de animales por grupo. Los datos fueron comparados mediante el test *t* de Student, considerando $p < 0,05$ como significativo. ** $p < 0,01$ con respecto al control.

3.1.3 Efecto del tratamiento con valerato de estradiol y la desnervación sobre la concentración del péptido NGF en el ovario

Para determinar la concentración de NGF en las muestras de interés, se realizó un ELISA, con un *kit* comercial. En la figura 6 se observa que no existen cambios en la concentración de NGF, tanto en los animales SONX ($8,7\pm 0,7$ ng/mg; n: 15; ns), como en los EV ($7,9\pm 0,7$ ng/mg; n: 12; ns) y como en los EV SONX ($7,9\pm 0,8$ ng/mg; n: 10, ns) con respecto al control ($8,4\pm 0,5$ ng/mg; n: 13).

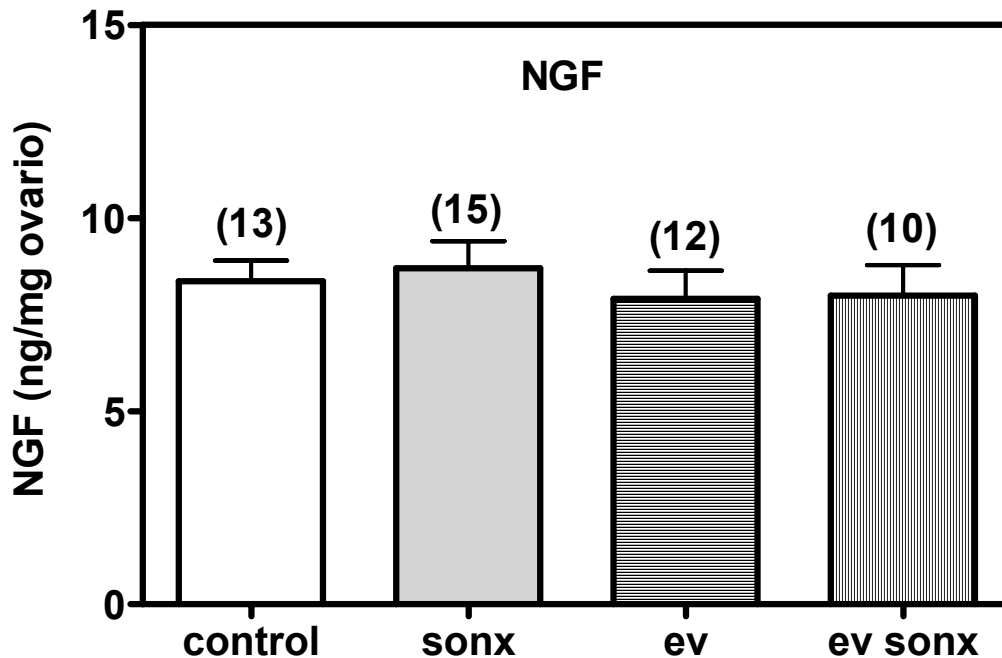


Figura 6: Concentración de NGF.

La figura representa los ng de NGF por mg de ovario en animales control ($8,4\pm 0,5$), control desnervado (SONX) ($8,7\pm 0,7$), con quistes (60 días post administración de dosis única de valerato de estradiol) (EV) ($7,9\pm 0,7$) y con quistes desnervados (EV SONX) ($7,9\pm 0,8$). La determinación se realizó mediante un kit comercial de ELISA para NGF (Promega). Las barras verticales representan el valor promedio \pm error estándar y los valores entre paréntesis corresponden al número de animales por grupo. Los datos fueron comparados mediante el test *t* de Student, sin que se encontraran diferencias significativas.

3.1.4 Efecto del tratamiento con EV y la desnervación sobre la concentración de mRNA para p75NTR en el ovario

La concentración de mRNA para p75NTR en ovario se midió mediante RT-PCR semicuantitativo. Los resultados de la figura 7 muestran que existen cambios estadísticamente significativos en la concentración de mRNA para p75NTR en los animales SONX ($2,3 \pm 0,6$; n: 5; $p < 0,05$), EV ($2,2 \pm 0,6$; n: 4; $p < 0,05$) y EV SONX ($3,0 \pm 0,9$; n: 3; $p < 0,001$) con respecto al control ($1,0 \pm 0,1$; n: 9).

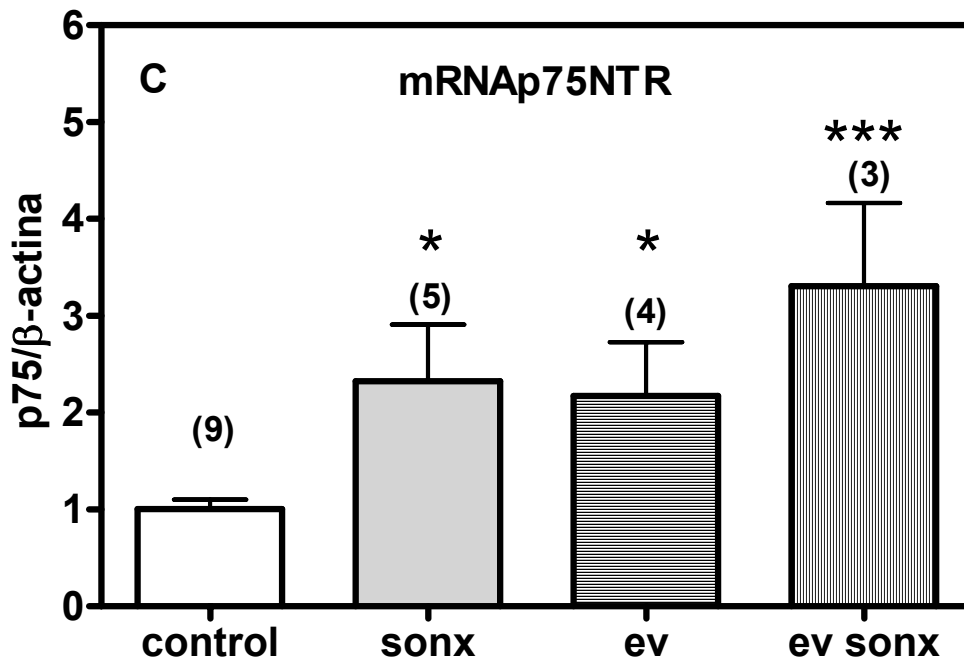


Figura 7: Concentración de mRNA para p75NTR.

La figura representa la concentración de mRNA para p75NTR en animales control ($1,0 \pm 0,1$), control desnervado (SONX) ($2,3 \pm 0,6$), con quistes (60 días post administración de dosis única de valerato de estradiol) (EV) ($2,2 \pm 0,6$) y con quistes desnervados (EV SONX) ($3,0 \pm 0,9$). El contenido de mRNA para p75NTR se expresa como el número de pixeles correspondientes a la banda del producto de PCR, obtenidos del gel de electroforesis, con respecto a los pixeles obtenidos para el gen de expresión constitutiva β-actina. Los valores son corregidos al asignar el valor 1 a la razón pixeles mRNA p75NTR/pixeles mRNA β-actina de los animales control. El valor absoluto para los controles fue de $0,6 \pm 0,2$ (pixeles NGF/pixeles β-actina \pm SEM). Las barras verticales representan el valor promedio \pm error estándar y los valores entre paréntesis corresponden al número de animales por grupo. Los datos fueron comparados mediante el test *t* de Student, considerando $p < 0,05$ como significativo. * $p < 0,05$ con respecto al control; *** $p < 0,001$ con respecto al control.

3.1.5 Efecto del tratamiento con valerato de estradiol y la desnervación sobre la concentración de NE en el ovario

Las muestras de ovario de las diferentes series experimentales fueron homogeneizadas en tampón Dulbecco y la NE fue cuantificada en un HPLC asociado a un detector electroquímico. Los resultados se expresan en pg/mg de ovario. En la figura 8 se observa que la concentración de NE en los animales SONX disminuye de manera significativa con respecto al control ($14,1 \pm 5,5$ pg/mg; n: 7 vs $108,3 \pm 33,6$ pg/mg; n: 3; $p < 0,01$). Por el contrario, los animales EV presentan un aumento en la concentración de NE ($343,0 \pm 3,0$ pg/mg; n: 5; vs $108,3 \pm 33,6$ pg/mg ovario; n: 3; $p < 0,01$) con respecto al control. Los EV SONX presentan una menor concentración de NE, siendo comparables con un animal control ($91,5 \pm 20,9$ pg/mg; n: 4 vs $108,3 \pm 33,6$ pg/mg ovario; n: 3, ns).

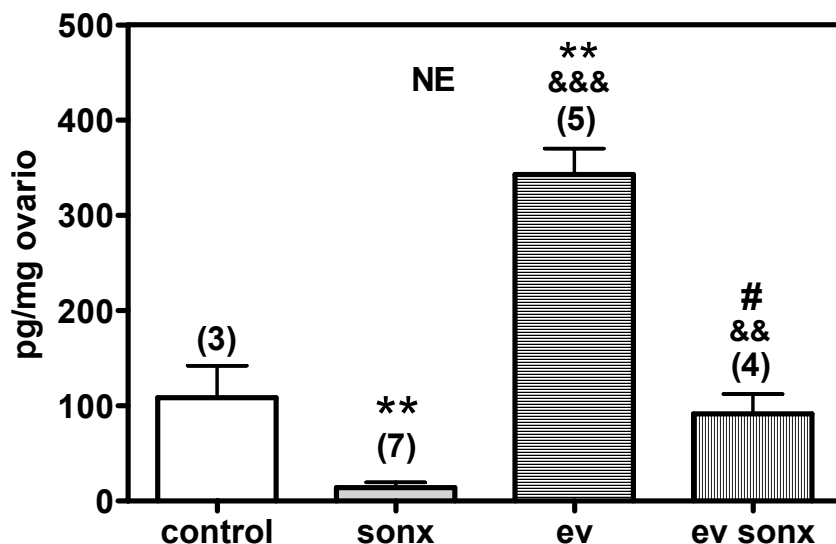


Figura 8: Concentración de NE.

La figura representa los pg de NE por mg de ovario en animales control ($108,3 \pm 33,6$), control desnervado (SONX) ($14,1 \pm 5,5$), con quistes (60 días post administración de dosis única de valerato de estradiol) (EV) ($343,3 \pm 27,2$) y con quistes desnervados (EV SONX) ($91,5 \pm 20,9$). La determinación se realizó mediante HPLC acoplado a un detector electroquímico. Los pesos de los ovarios expresados en mg fueron los siguientes: control ($45,1 \pm 0,7$), SONX ($45,8 \pm 4,6$), EV ($19,0 \pm 2,9$) y EV SONX ($22,2 \pm 4,7$). Las barras verticales representan el valor promedio \pm error estándar y los valores entre paréntesis corresponden al número de animales por grupo. Los datos fueron comparados mediante el test *t* de Student, considerando $p < 0,05$ como significativo.

** $p < 0,01$ con respecto al control; && $p < 0,01$ con respecto a sonx; &&& $p < 0,001$ con respecto a sonx; # $p < 0,05$ con respecto a ev.

En la figura 9 se muestra el gráfico obtenido al expresar los ng de NE por ovario. Se observa que los animales SONX presentan una disminución en el contenido de NE con respecto al control ($0,6\pm0,2$; n: 7 vs $4,9\pm1,4$; n: 3; $p<0,01$). Los animales EV y EV SONX no difieren del control, pero si entre ellos ($6,5\pm1,0$; n: 5 vs $2,2\pm0,8$; n: 4; $p<0,05$).

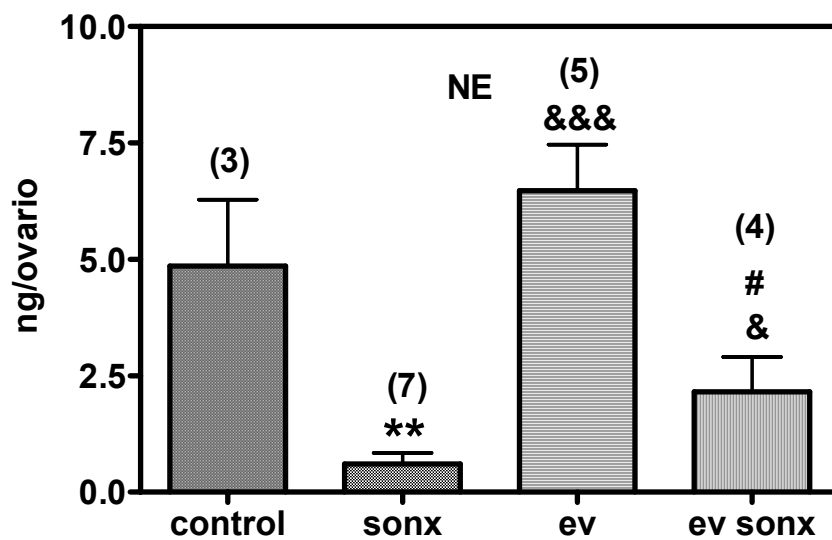


Figura 9: Contenido de NE.

La figura representa los ng de NE por ovario en animales control ($4,9\pm1,4$), control desnervado (SONX) ($0,6\pm0,2$), con quistes (60 días post administración de dosis única de valerato de estradiol) (EV) ($6,5\pm1,0$) y con quistes desnervados (EV SONX) ($2,2\pm0,8$). La determinación se realizó mediante HPLC acoplado a un detector electroquímico. Las barras verticales representan el valor promedio \pm error estándar y los valores entre paréntesis corresponden al número de animales por grupo. Los datos fueron comparados mediante el test *t* de Student, considerando $p<0,05$ como significativo.

** $p<0,01$ con respecto al control; & $p<0,01$ con respecto a sonx; &&& $p<0,001$ con respecto a sonx; # $p<0,05$ con respecto a ev.

3.2 Objetivo 2

Caracterizar al sistema nervioso ovárico intrínseco mediante la búsqueda de un marcador molecular

3.2.1 Efecto del tratamiento con valerato de estradiol y la desnervación sobre la concentración de mRNA TH en el ovario

La cuantificación del mRNA para TH en ovario se realizó mediante un ensayo de RT-PCR en Tiempo Real. Las curvas de calibración obtenidas para la amplificación de este transcrito se muestran en la figura 10. Como se observa en la figura 11, el transcrito está presente en todas las condiciones estudiadas. En los animales EV (1479 ± 369 , n: 10; ns) y EV SONX (2077 ± 1038 ; n: 7; ns) no existen diferencias en la concentración del transcrito con respecto al control ($1718 \pm 787,4$; n: 10). Por el contrario los animales SONX presentan un aumento significativo en la concentración de este transcrito (21996 ± 8259 ; n: 5; $p < 0,01$) en comparación a un animal control.

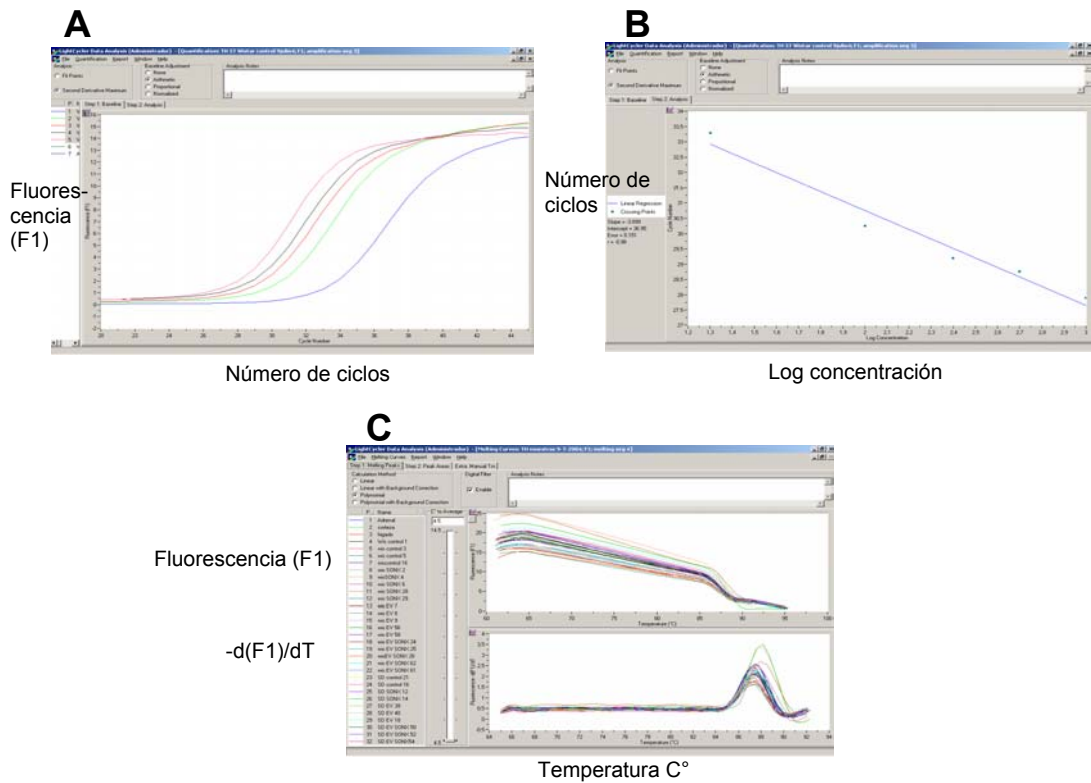


Figura 10: Curvas de calibración para amplificación de mRNA para TH mediante RT-PCR en Tiempo Real.

En **A** se muestra el perfil de amplificaciones para mRNA para TH generado usando diferentes cantidades de cDNA en un animal control. En **B** se muestra el análisis de regresión lineal de la curva estándar obtenida con diferentes concentraciones de cDNA. En **C** (parte superior) se muestra la curva de desapareamiento para el producto de PCR amplificado en las muestras de cada animal. El que el producto amplificado en todas las muestras presente el mismo patrón de desapareamiento indica que éste es el mismo en todos los animales estudiados. En **C** (parte inferior) se muestra el análisis matemático de la curva de desapareamiento que permite establecer que el producto amplificado en cada muestra es efectivamente el mismo, ya que todos presentan un máximo a la misma temperatura.

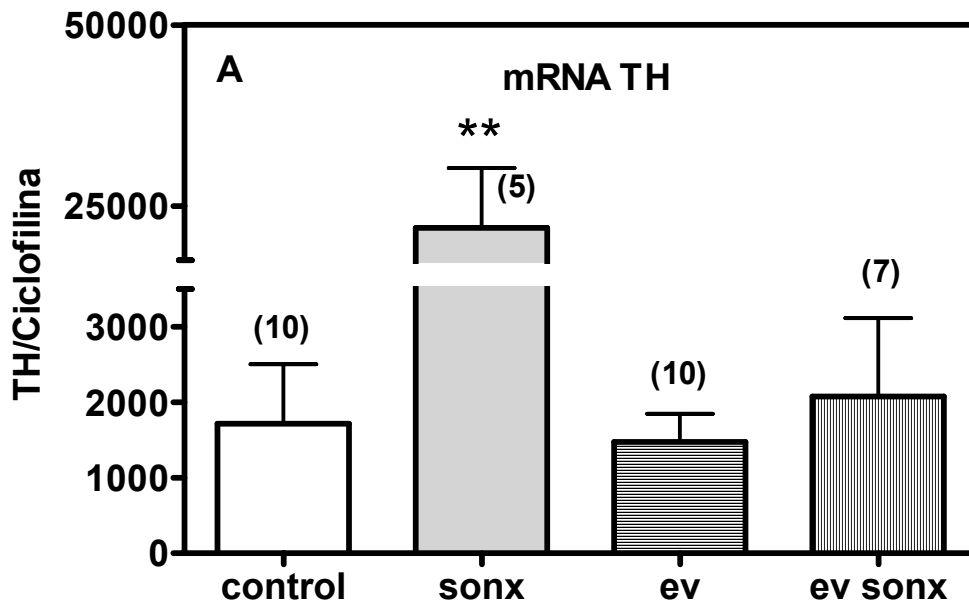


Figura 11: Concentración de mRNA para TH.

La figura muestra la concentración de mRNA para TH, obtenida mediante RT-PCR en Tiempo Real para animales control (1718±787), control desnervado (SONX) (21996±8259), con quistes (60 días post administración de dosis única de valerato de estradiol) (EV) (1479±369) y con quistes desnervados (EV SONX) (2077±1038). Los valores representan la concentración de mRNA para TH dividida por la concentración de mRNA para el gen de expresión constitutiva ciclofilina para cada animal. Los valores de ciclofilina fueron normalizados con respecto al control. Las barras representan el valor promedio ± error estándar y los valores entre paréntesis corresponden al número de animales analizados por grupo. Los datos fueron comparados mediante el test *t* de Student, considerando $p < 0,05$ como significativo.

** $p < 0,01$ con respecto al control.

3.2.2 Cambios en la inmunorreactividad para TH en ovarios de rata por efecto de desnervación y de administración de valerato de estradiol

Mediante el uso del anticuerpo anti-TH en cortes de tejido ovárico, fue posible observar la presencia de fibras nerviosas inmunorreactivas para TH en todas las series experimentales estudiadas. Las fibras se encuentran asociadas mayoritariamente a estructuras foliculares y a vasos sanguíneos (figura 12). En los animales SONX existe una disminución de las estructuras marcadas y en los animales EV un aumento de éstas, lo que se condice con lo reportado por la literatura (Lara y cols. 1993) en relación a un aumento en las fibras nerviosas

catecolaminérgicas en la situación de quistes. En los animales EV SONX se ve inmunorreactividad similar a la presente en animales control.

No se observan, de manera evidente, marcas inmunorreactivas para estructuras compatibles con cuerpos neuronales en ninguna de las series experimentales estudiadas.

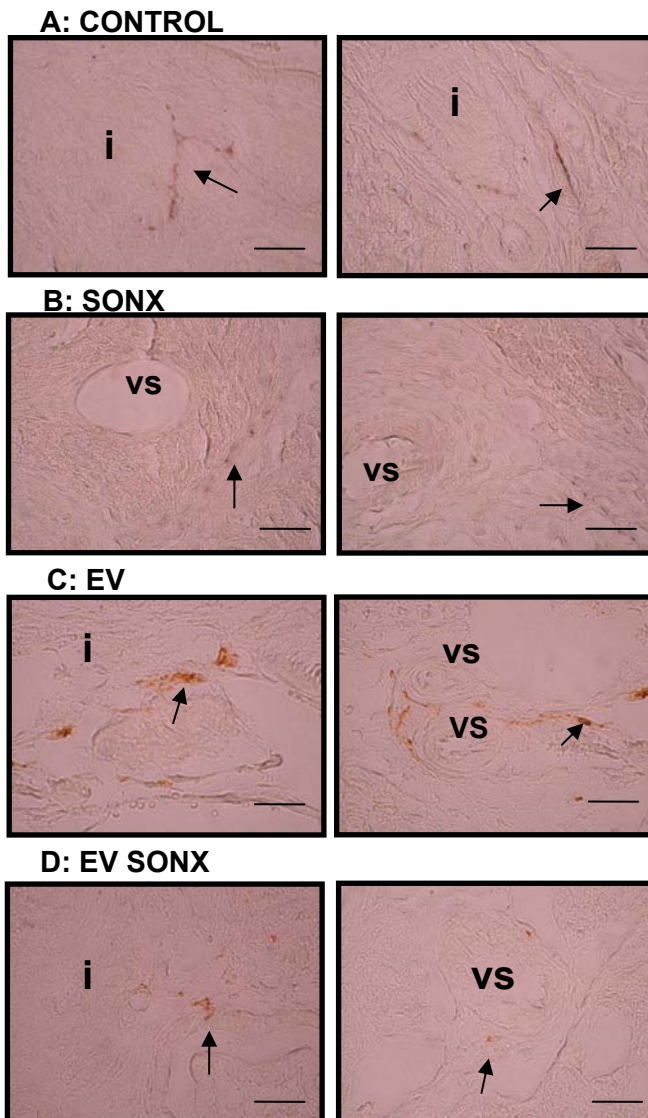


Figura 12: Inmunohistoquímica para TH en las diferentes series experimentales.

Las fotografías corresponden a cortes de tejido de ovario tratados con anti-TH (DiaSorin 1:500). En **A** (control), en el panel izquierdo se observa una célula con forma de neurona, que se encuentra en el tejido intersticial barra: 25 μ m. En el panel derecho hay marcas de fibras presentes en zonas intersticiales, barra: 62,5 μ m. **B** corresponde a cortes de ovarios SONX, se observan marcas para TH en zonas cercanas a los vasos sanguíneos, barra: 62,5 μ m. **C** corresponde a animales EV. Las fibras se encuentran principalmente en la zona de las células intersticiales y cerca de los vasos sanguíneos y están en mayor cuantía que en la situación control, barra: 62,5 μ m. **D** corresponde a la inmunotinción de fibras en animales EV SONX, éstas se encuentran en las mismas zonas que los cortes anteriores, pero en menor cuantía con respecto a la situación quística, barra: 62,5 μ m. Las flechas corresponden a las marcas de inmunotinción. vs: vaso sanguíneo, i: zona intersticial.

3.2.3 Inmunorreactividad para NET en ovario control

La presencia de NET se analizó mediante inmunohistoquímica en cortes de tejido de ovario control. En la figura 13 no se observan marcas claras de inmunotinción para este transportador (**B**) en comparación con el control negativo (**A**), como sí ocurre para el control positivo.

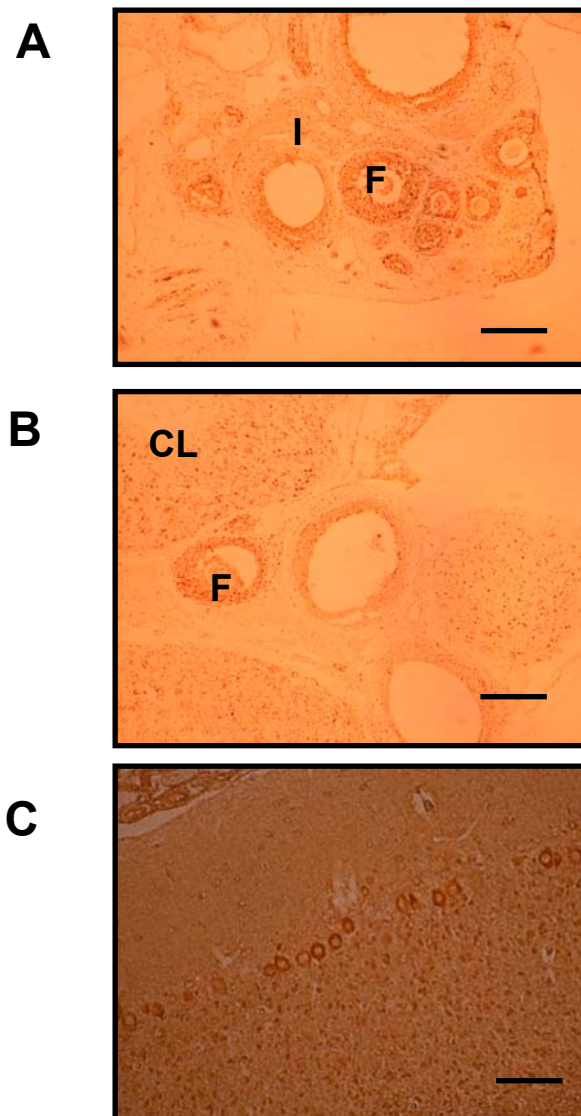


Figura 13: Inmunohistoquímica para NET en animales control

En las fotografías se observa cortes de tejido con anti-NET (Chemicon 1:250). **A** corresponde a un control negativo con suero normal de conejo. **B** corresponde a un corte de ovario tratado con rabbit anti-NET, en el no se observan diferencias significativas en la inmunotinción con respecto al control negativo. **C** corresponde a un control positivo para NET en células del cerebelo. Barra en A y B: 500 μ m, en C barra: 250 μ m. F: folículos; CL: cuerpos lúteos; I: células intersticiales.

3.2.4 Efecto del tratamiento con valerato de estadiol y la desnervación sobre la concentración de mRNA para DAT en el ovario

La cuantificación del mRNA para DAT en ovario se realizó mediante un ensayo de RT-PCR en Tiempo Real. Los datos de la curva de calibración se muestran en la figura 14. Como se observa en la figura 15, el transcrito está presente en todas las condiciones estudiadas. En los animales EV ($1,3 \pm 0,2$; n:8; ns) y EV SONX ($1,0 \pm 0,3$; n: 7; ns) no existen diferencias en la concentración del transcrito con respecto al control ($1,7 \pm 0,5$; n:4). Por el contrario los animales SONX presentan un aumento significativo en la concentración de este transcrito ($9,2 \pm 2,1$; n: 6; $p < 0,05$) en comparación a un animal control.

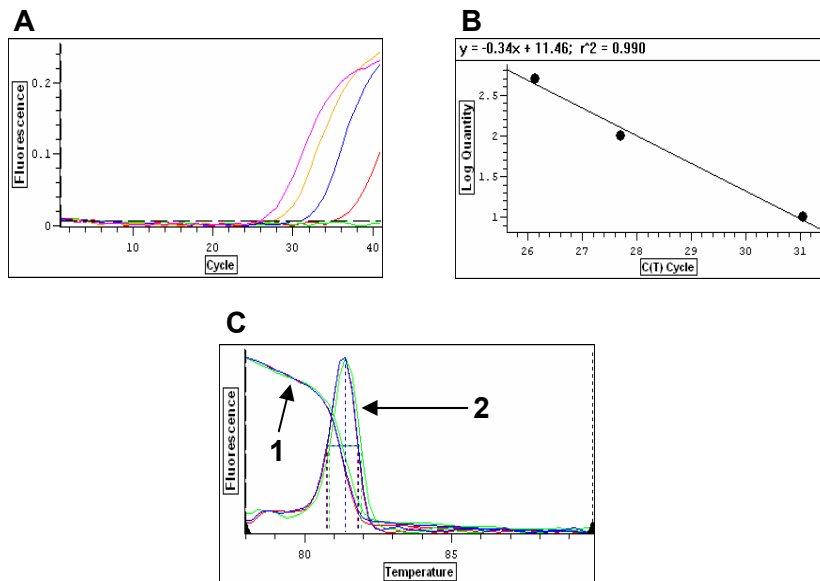


Figura 14: Curvas de calibración para amplificación de mRNA para DAT mediante RT- PCR en Tiempo Real

En A se muestra el perfil de amplificaciones para mRNA para DAT a partir de cDNA en un animal control. En B se muestra el análisis de regresión lineal de la curva estándar obtenida con diferentes concentraciones de cDNA. En C (1) se muestra la curva de desapareamiento para el producto de PCR amplificado en las muestras de cada animal. El que el producto amplificado en todas las muestras presente el mismo patrón de desapareamiento indica que éste es el mismo en todos los animales estudiados. En C (2) se muestra el análisis matemático de la curva de desapareamiento que permite establecer que el producto amplificado en cada muestra es efectivamente el mismo, ya que todos presentan un máximo a la misma temperatura.

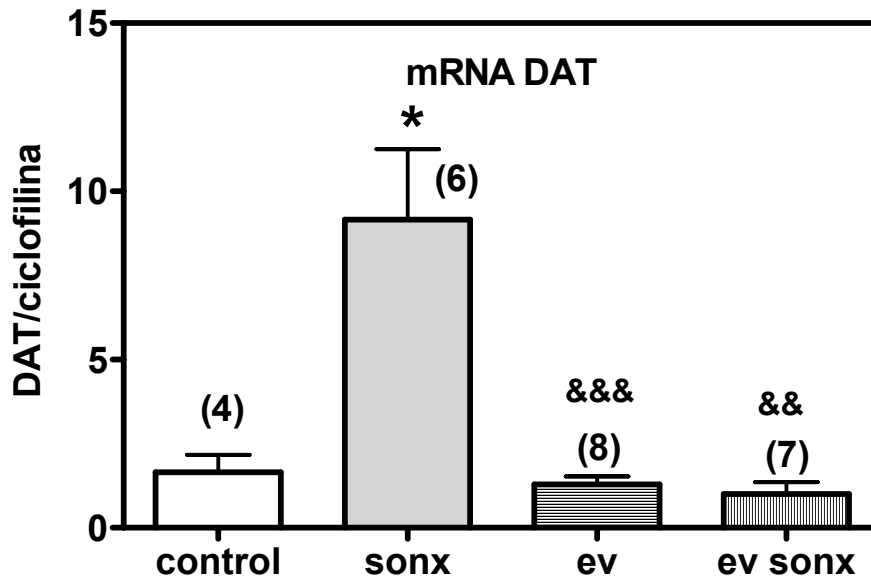


Figura 15: Concentración de mRNA para DAT.

La figura representa la concentración de mRNA para DAT obtenida por RT-PCR en Tiempo Real en animales control ($1,61 \pm 0,51$), control desnervado (sonx) ($9,16 \pm 2,0$), con quistes (60 días post administración de dosis única de valerato de estradiol) (ev) ($1,29 \pm 0,2$) y con quistes desnervados (ev sonx) ($1,00 \pm 0,34$). Los valores representan la concentración de mRNA para DAT dividida por la concentración de mRNA para el gen de expresión constitutiva ciclofilina para cada animal. Las barras representan el valor promedio \pm error estándar y los valores entre paréntesis corresponden al número de animales por grupo. Los datos fueron comparados mediante el test *t* de Student, considerando $p < 0,05$ como significativo.

* $p < 0,05$ con respecto al control, && $p < 0,01$ con respecto a sonx, &&& $p < 0,001$ con respecto a sonx.

3.2.5 Inmunorreactividad para DAT en ovarios de las diferentes series experimentales

Mediante el uso del anticuerpo anti-DAT en cortes de tejido ovárico (figura 16) fue posible observar la presencia de estructuras celulares inmunorreactivas para DAT en animales control (**A, C, D**) y la desaparición de éstas con el uso de anticuerpo preabsorbido con el péptido DAT (**B, D, F**). En la figura 17 se observa que existe una marca intensa para DAT en las células de la granulosa, células intersticiales y células lúteas de todas las muestras analizadas. Es interesante señalar que no existe marca inmunorreactiva en las células de la teca en ninguno de los cortes estudiados.

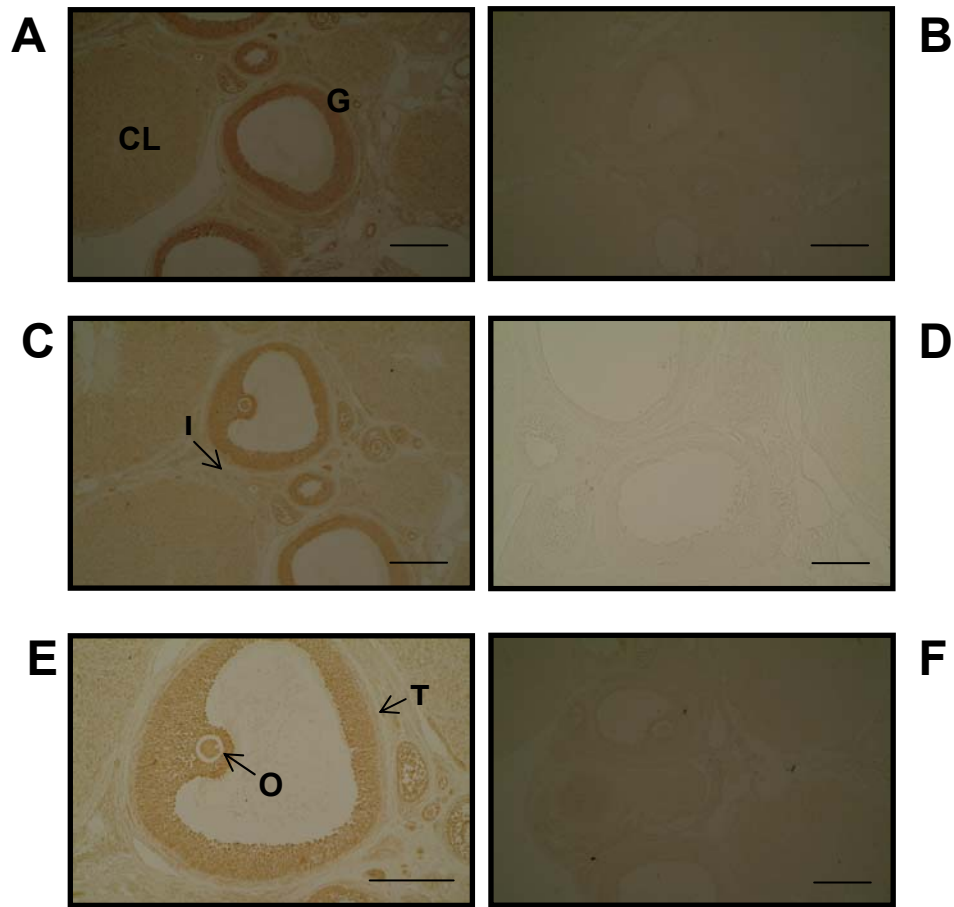


Figura 16: Inmunohistoquímica para DAT en ovarios control.

Las fotografías corresponden a cortes de tejido de ovario control tratados con anti-DAT (Alphadiagnostic Inc. 1:500) y anti-DAT preadsorbido con el péptido DAT. **A y C** se observa la marca para DAT en las células de la Granulosa, en células del cuerpo lúteo y células intersticiales. **E** corresponde a una magnificación de C y se observa que la marca para DAT también está presente en el ovocito. Hay que destacar que las células de la Teca carecen de marca para DAT. **B, D y F** corresponden a tejido tratado con anti-DAT preadsorbido con el péptido DAT. Se observa claramente la desaparición de la marca que se obtiene al tratar con el anticuerpo sin adsorber, lo que indica que las marcas observadas en A, C y E son específicas. **T:** teca, **G:** granulosa, **O:** ovocito, **L:** cuerpo lúteo, **I:** células intersticiales. Barra: 500µm excepto E: 250 µm.

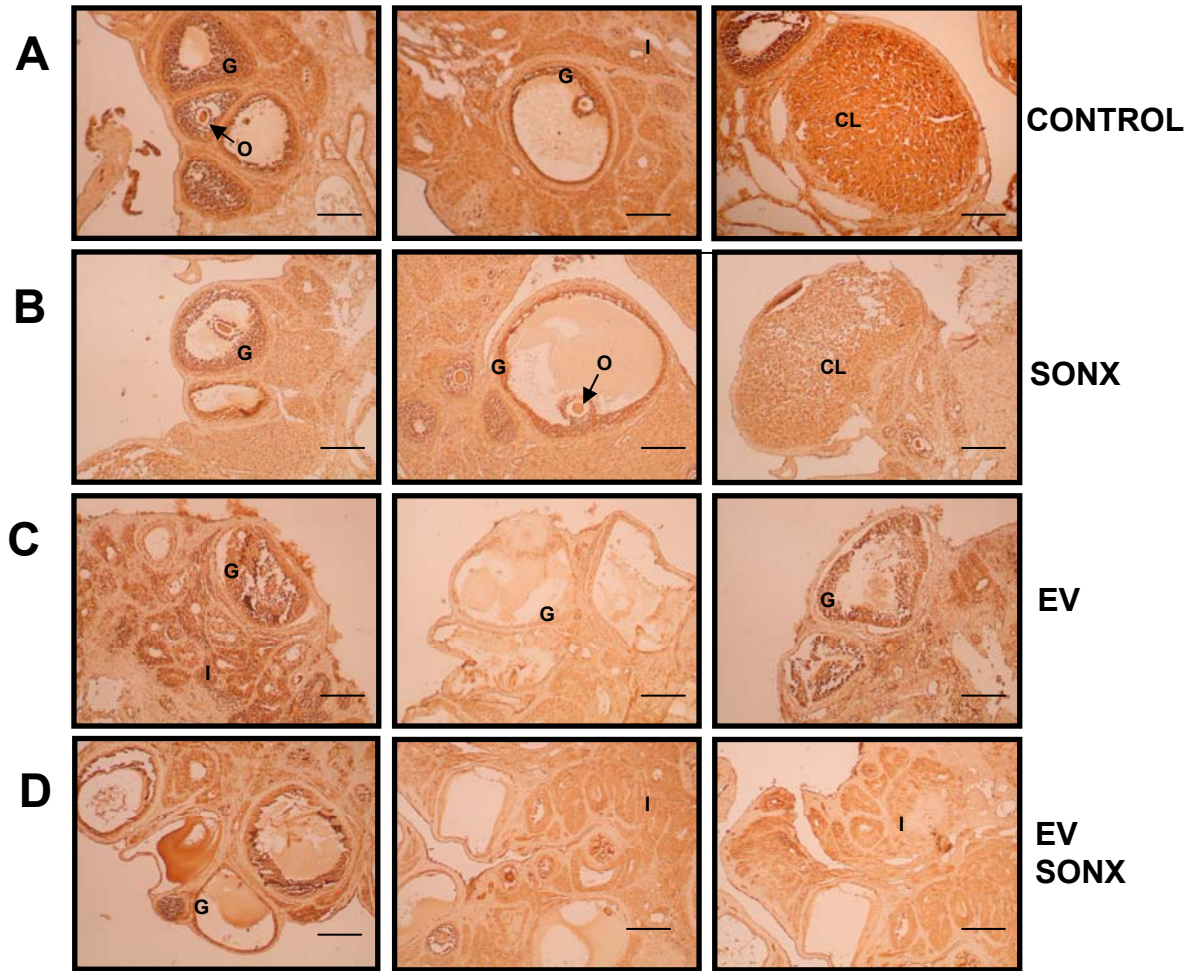


Figura 17: Inmunohistoquímica para DAT en series experimentales.

Las fotografías corresponden a cortes de tejido de ovario tratados con anti-DAT (Alphadiagnostic Inc. 1:500). En **A** se muestran cortes de un ovario control donde se observan folículos con una gran marca para DAT en las células de la granulosa (G) y el ovocito (O). También esta marca está presente en células lúteas (CL) y células intersticiales (I). **B** corresponde a cortes de ovario SONX y nuevamente la marca en clara en células de la granulosa, ovocito, células intersticiales y cuerpos lúteos. **C** corresponde a ovarios de animales EV, hay marca presente en las granulosa de los quistes e intersticios. **D** fotografía de cortes de animales EV SONX, existe marca en las granulosa de los quistes e intersticios. Barra: 500µm.

3.3 OBJETIVO 3

Establecer la participación del sistema nervioso ovárico intrínseco en la hiperactividad nerviosa característica de la condición quística.

3.3.1 Porcentaje de liberación fraccional de ³HNE en las diferentes series experimentales

El porcentaje de liberación fraccional de ³HNE es un indicador de la capacidad de liberación de NE intraovárica. En la figura 18 se observa que los animales SONX disminuyen su capacidad de liberación de ³HNE con respecto al control ($8,0 \pm 1,2\%$; n: 6 vs $15,3 \pm 1,6\%$; n: 9 $p < 0,01$). Por el contrario, en los animales EV aumenta de manera significativa la capacidad de liberación con respecto al control ($30,5 \pm 1,0\%$; n: 5 vs $15,3 \pm 1,6\%$; n: 9 $p < 0,001$). La desnervación en los animales con quistes (EV SONX) induce una disminución en la capacidad de liberación con respecto a los animales EV ($13,9 \pm 2,3\%$; n: 5 vs $30,5 \pm 1,0\%$; n: 5; $p < 0,001$), siendo mayor, sin embargo a la presentada en la situación SONX ($13,9 \pm 2,3\%$; n: 5 vs $8,0 \pm 1,2\%$; n: 6; $p < 0,05$).

3.3.2 Incorporación de ³HNE por efecto de valerato de estradiol y desnervación

La incorporación de ³HNE es un indicador de la cantidad de estructuras intraováricas involucradas en la incorporación fisiológica de NE. En la figura 19 se observa que los animales SONX disminuyen su capacidad de incorporación de ³HNE con respecto al control (1723 ± 492 dpm; n: 8 vs 3936 ± 1080 dpm; n: 4; $p < 0,05$). Por el contrario, en los animales EV aumenta de manera significativa la capacidad de incorporación con respecto al control (8907 ± 1327 dpm; n: 4 vs 3936 ± 1080 dpm; n: 4; $p < 0,001$). La desnervación en estos animales (EV SONX) no disminuye la capacidad de incorporación, siendo estadísticamente comparable con la de los animales EV (6778 ± 2804 dpm; n: 3 vs 8907 ± 1327 dpm; n: 4; ns).

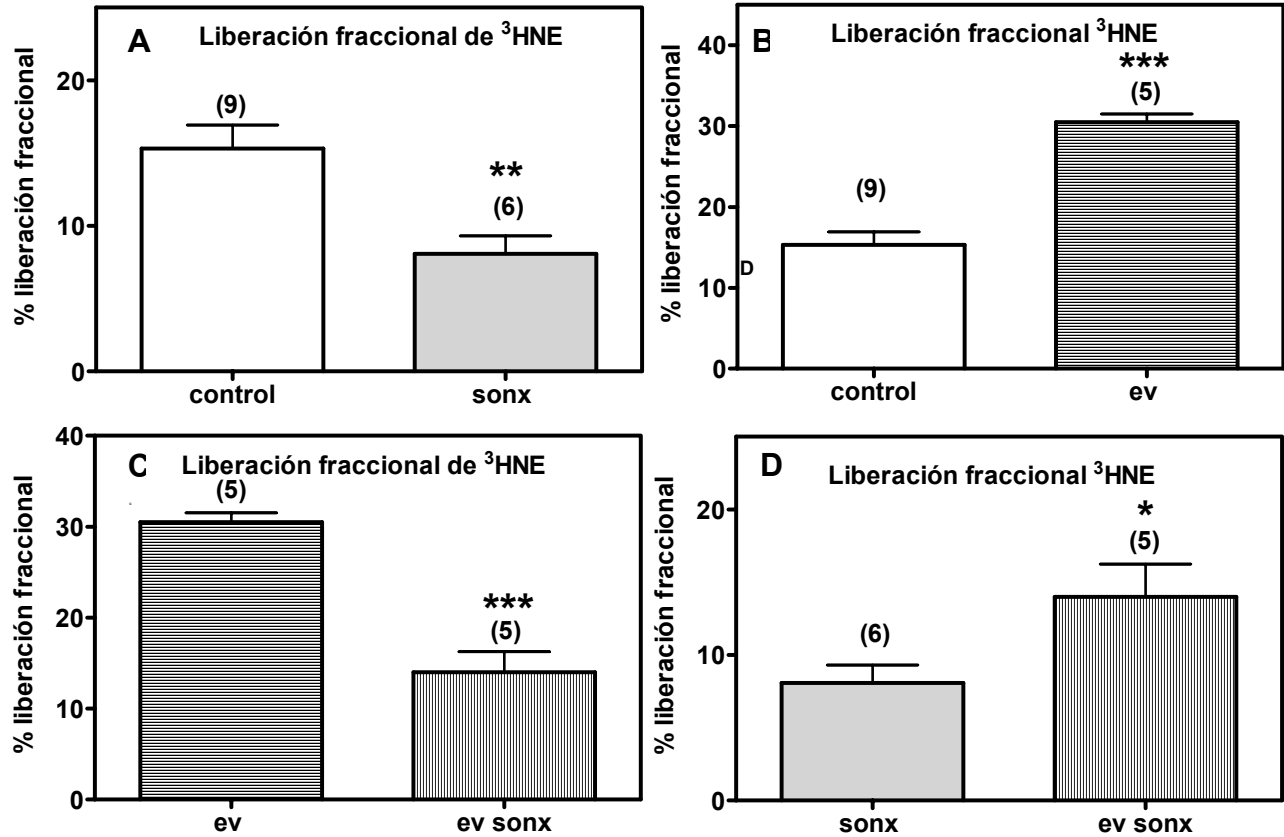


Figura 18: Porcentaje de liberación fraccional de ³HNE recién incorporada.

La figura muestra el porcentaje de liberación fraccional de ³HNE recién incorporada en animales control (15,31±1,6 %), control desnervados (SONX) (8,03±1,2 %), con quistes (60 días post administración de dosis única de valerato de estradiol) (EV) (30,5±1,0 %) y con quistes desnervados (EV SONX) (13,9±2,3%). El tejido es incubado con ³HNE *in vitro*, posteriormente se somete a un pulso eléctrico transmural y se colectan las fracciones eluidas. En un contador beta se cuantifica la cantidad de radioactividad presente en cada una de las fracciones colectadas. En **A** se muestra la diferencia entre animales control y SONX. En **B** se grafica la diferencia entre animales control y animales EV. En **C** se compara la capacidad de liberación entre animales EV y EV SONX. En **D** se muestra la diferencia entre los animales SONX y EV SONX. Las barras verticales representan el valor promedio ± error estándar y los valores entre paréntesis corresponden al número de animales analizados por grupo. Los datos fueron comparados mediante el test *t* de Student, considerando $p < 0,05$ como significativo.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ en relación a la respectiva barra de la izquierda.

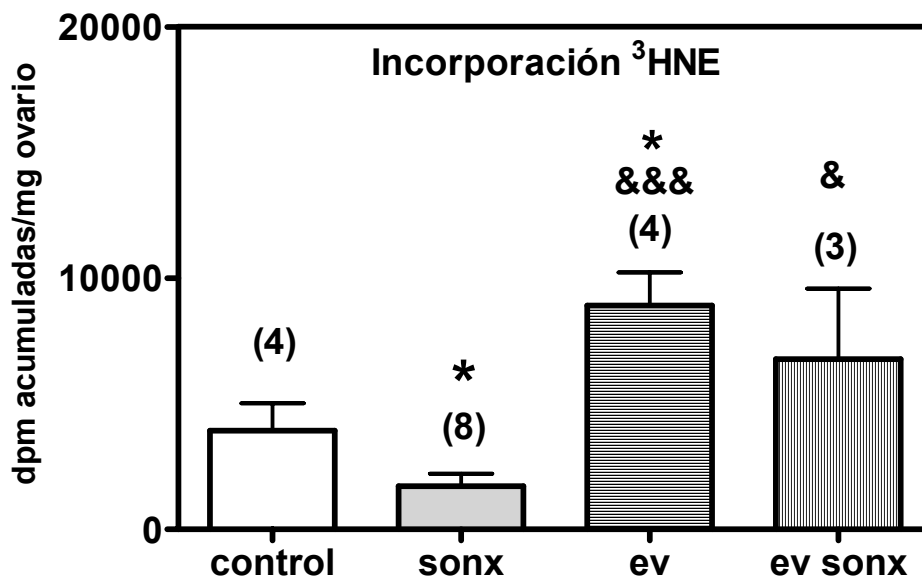


Figura 19: Incorporación de ³HNE en el tejido ovárico.

La figura representa la incorporación de ³HNE (dpm/mg ovario) en un medio Krebs normal en animales control (3936±1080), control desnervados (SONX) (1723±492), con quistes (60 días post administración de dosis única de valerato de estradiol) (EV) (8907±1327) y con quistes desnervados (EV SONX) (6778±2804). Los ovarios fueron incubados por 30min en medio Krebs normal con ³HNE. Posteriormente se lavaron y la radiactividad incorporada se cuantificó en el tejido como índice de incorporación de norepinefrina. Las barras verticales representan el valor promedio ± error estándar y los valores entre paréntesis corresponden al número de animales por grupo. Los datos fueron comparados mediante el test *t* de Student, considerando *p*<0,05 como significativo.

* *p*<0,05 con respecto al control; & *p*<0,05 con respecto a sonx; &&& *p*<0,001 con respecto a sonx.

3.3.3 Efecto de la cocaína en la incorporación de ³HNE

Se evaluó el efecto de la cocaína sobre la incorporación de ³HNE en ovario de rata de las diferentes series experimentales. En la figura 20 se observa que en todas las series experimentales existe una disminución en la incorporación de ³HNE, indicando un efecto de la cocaína sobre esta situación. Sin embargo se mantienen algunas de las diferencias entre los grupos experimentales. Los animales SONX disminuyen su capacidad de incorporación de ³HNE en presencia de cocaína con respecto al control (271±37dpm; n: 8 vs 627±186dpm; n: 4; *p*<0,05). Así mismo, los animales EV siguen presentando un aumento

significativo en la capacidad de incorporación con respecto al control (1279 ± 55 dpm; n: 4 vs 627 ± 186 dpm; n: 4; $p < 0,001$). Sin embargo la cocaína es capaz de disminuir en forma significativa la capacidad de incorporación en animales EV SONX con respecto a EV (613 ± 22 dpm; n: 4 vs 1279 ± 55 dpm, n: 4 $p < 0,05$).

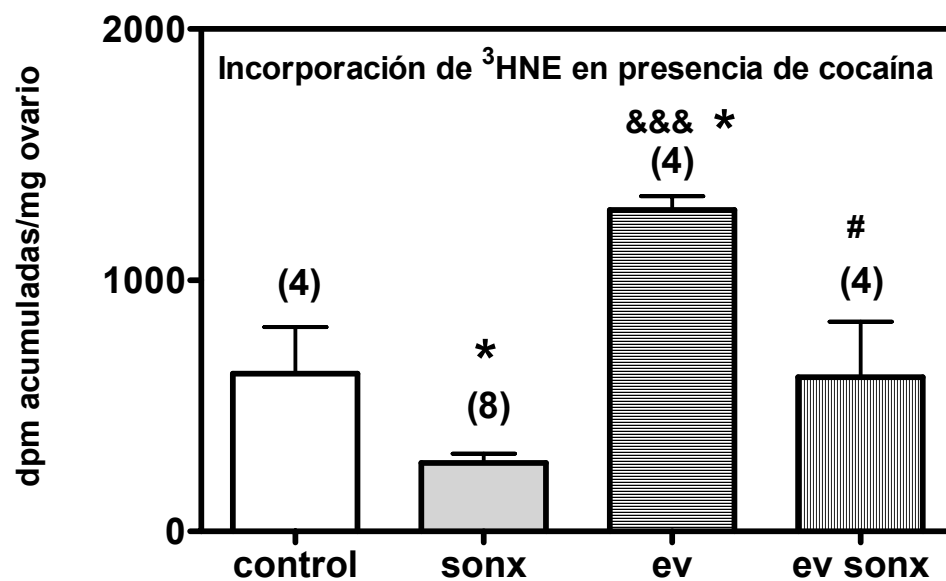


Figura 20: Incorporación de ³HNE en tejido ovárico en presencia de cocaína.

La figura representa la incorporación de ³HNE (dpm/mg ovario) en ovario en presencia de cocaína $10 \mu\text{M}$ en animales control (627 ± 186), control desnervados (SONX) (271 ± 37), con quistes (60 días post administración de dosis única de valerato de estradiol) (EV) (1279 ± 55) y con quistes desnervados (EV SONX) (613 ± 221). Los ovarios fueron incubados por 30min en medio Krebs normal con ³HNE en presencia de cocaína. Posteriormente se lavaron y la radiactividad incorporada en el tejido se cuantificó, como índice de incorporación de norepinefrina. Las barras verticales representan el valor promedio \pm error estándar y los valores entre paréntesis corresponden al número de animales por grupo. Los datos fueron comparados mediante el test *t* de Student, considerando $p < 0,05$ como significativo.

* $p < 0,05$ con respecto al control; &&& $p < 0,001$ con respecto a sonx; # $p < 0,05$ con respecto a ev.

3.3.4 Porcentaje de liberación de ^3HNE recién incorporada en células de granulosa

Se analizó la liberación de ^3HNE recién incorporada en células de granulosa ováricas aisladas provenientes de animales control. Esto para comprobar la participación fisiológica de estas células en la homeostasis de la NE ovárica. En la figura 21 se observa que después de un minuto de estímulo despolarizante con una solución Krebs con 80mM de potasio, el porcentaje de liberación de ^3HNE incorporada es estadísticamente mayor que la liberada en condiciones basales ($6,0\pm 1,0\%$ con respecto a $1,8\pm 0,6\%$; $p < 0,05$). La ^3HNE liberada en el postestímulo es menor que en el estímulo, pero no de manera significativa ($3,0\pm 0,8\%$ con respecto a $6,0\pm 1,0\%$; ns).

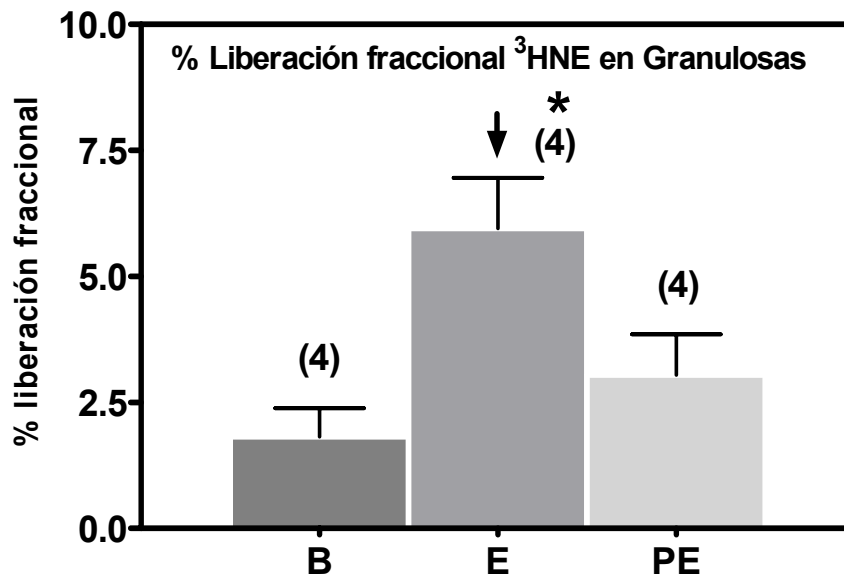


Figura 21: Porcentaje de liberación fraccional de ^3HNE recién incorporada en granulosa en animales control.

La figura muestra el porcentaje de liberación fraccional de ^3HNE recién incorporada en células de la granulosa de folículos de animales control de 35 días de edad. Las barras verticales representan el valor promedio \pm error estándar para las liberaciones correspondientes al basal (B; $1,8\pm 0,6\%$), estímulo (E; $6,0\pm 1,0\%$) y postestímulo (PE; $3,0\pm 0,8\%$). El estímulo se representa con una flecha y corresponde a medio Krebs 80mM K. Los datos fueron comparados mediante el test *t* de Student, considerando $p < 0,05$ como significativo.

* $p < 0,05$ con respecto al basal.

Los resultados experimentales presentados muestran que: a) existen elementos celulares intraováricos que participan en conjunto con la inervación simpática en la homeostasis de la NE dentro del ovario y b) que estos elementos se activan en la condición quística y son capaces de liberar NE de manera independiente de la inervación simpática ante un estímulo eléctrico. Se describe así, la existencia de un sistema nuevo de control de la función ovárica, al que llamaremos sistema nervioso intrínseco. Este sistema estaría conformado, al menos en parte, por las células de la granulosa y participaría en el control de la función ovárica tanto en condiciones normales como quísticas, siendo un elemento importante en la perpetuación del SOP.

El uso de animales ha sido útil para estudiar algunos aspectos de la patología. Es así que ratas adultas tratadas con una dosis única de valerato de estradiol (Brawer y cols. 1978) presentan cambios en la morfología ovárica y en la ciclicidad estral que son característicos. Los ovarios son de un tamaño menor que los de un animal control debido a la inexistencia de cuerpo lúteo y presentan quistes foliculares. Los animales, además, pierden la ciclicidad estral y se encuentran en estado de estro persistente, lo que es indicativo de anovulación. En esta tesis reproducimos el modelo experimental, propuesto por Brawer y cols., para el estudio del Síndrome de Ovario Poliquístico y evaluamos la participación del componente nervioso ovárico intrínseco en la condición quística.

4.1 Cambios en el contenido de NE

Como ya se había descrito anteriormente en nuestro laboratorio, usando este mismo modelo experimental (Lara y cols. 1993), en la condición quística y durante el proceso de generación de estas estructuras, existe un aumento en la

concentración y contenido de NE ovárica. Esto como reflejo del aumento de la actividad nerviosa. Por el contrario al desnervar a un animal control, la NE disminuye de manera ostensible, lo que indica que la inervación simpática es una fuente importante de NE intraovárica.

Para corroborar estos datos, en las series experimentales desarrolladas en esta tesis se cuantificó la concentración de NE intraovárica, encontrándose similitudes con lo descrito anteriormente para los animales EV y SONX. Esto es indicativo de que los animales estudiados se comportan de manera similar a lo descrito en la literatura. Es interesante notar, sin embargo, que aunque en los animales SONX la concentración de NE disminuye, permanece un 15% de la NE, la que puede provenir de elementos de la inervación intrínseca o del plexo nervioso. Esto es un primer indicio de la existencia de estructuras intraováricas que son capaces de almacenar y/o sintetizar NE, de manera independiente de la inervación simpática extrínseca y/o estimulada por la ausencia de ésta. Así mismo en la condición EV SONX, la desnervación provoca una disminución en la concentración de NE, pero sólo hasta niveles similares al control, indicando que estas estructuras intrínsecas se activan en la condición quística participando activamente en el aumento de la NE intraovárica.

4.2 Cambios en el complejo neurotrófico NGF/p75NTR una vez establecida la condición quística

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se ha establecido que en la condición quística generada en ratas, existe un aumento en la actividad de los nervios simpáticos ováricos (Lara y cols. 1993), debiéndose esto a la participación directa del complejo neurotrófico NGF/p75NTR (Lara y cols. 2000). La activación de los nervios simpáticos es previa a la aparición de quistes y se mantiene una vez que éstos han aparecido. Desde el punto de vista funcional se traduce en un mayor porcentaje de incorporación y contenido de NE intraováricos y una mayor capacidad de liberación de NE recién incorporada

(Lara y cols. 1993). El que esta actividad simpática, anormalmente elevada, contribuya directamente a la anovulación, quedó demostrada al seccionar quirúrgicamente el nervio ovárico superior (Barría y cols. 1993). Este nervio, que es la fuente principal de fibras simpáticas que inervan al ovario (Lawrence y Burden 1980), está asociado anatómicamente al ligamento suspensorio ovárico y al seccionarse, se observa una recuperación de los ciclos estrales.

Durante el proceso de generación de quistes ováricos por administración de valerato de estradiol (30 días postadministración), existe un aumento en la concentración de moléculas del complejo NGF/p75NTR (Lara y cols. 2000), causantes del aumento en la actividad nerviosa. En esta tesis, los grupos experimentales con quistes (EV y EV SONX) fueron evaluados 60 días postadministración de valerato de estradiol, es decir, una vez que se ha establecido claramente la condición quística (Lara y cols. 2000). A este tiempo, la presencia de quistes y la actividad nerviosa elevada, característica de la condición quística, parece ser sustentada por niveles normales de NGF y un aumento sostenido en el mRNA p75NTR (que también se reflejaría en la proteína, Lara y cols. 2000). El hecho que aumente el mRNA y posiblemente la proteína para p75NTR permitiría una mayor internalización y, por ende, una mayor disponibilidad intraneuronal de NGF. Esta mayor disponibilidad de NGF en el cuerpo neuronal puede favorecer la transcripción y traducción de las enzimas de la biosíntesis de NE (Lara y cols. 2000). El receptor p75NTR no sólo participa en la internalización de NGF desde sus sitios de síntesis a las fibras sensibles a NGF, lo que puede inducir una disminución en el péptido por recaptura vía neuronal (Johnson, Taniuchi y DiStefano 1988; Chao y Hempstead 1995), sino que también puede colaborar con el receptor de alta afinidad TrkA, formando un heterodímero que potencia ciertas respuestas celulares a las neurotrofinas (Hantzopoulos y cols. 1994). Cuando desnervamos animales con quistes aumentó el mRNA para NGF y para p75NTR, lo que apuntaría a que en esta situación específica, se facilitaría la activación de

elementos celulares que dependen en mayor grado de la presencia de NGF y que presentan el receptor. Al desaparecer el control simpático extrínseco, las estructuras intraováricas, que ya están más activas por efecto del valerato de estradiol, responderían favoreciendo la síntesis de moléculas de este complejo, de manera de mantener su actividad y suplir la acción de los nervios simpáticos en el control de la homeostasis de NE, perdida por la desnervación. Estas estructuras podrían corresponder al componente celular intraovárico de la inervación simpática extrínseca y también a células del sistema nervioso ovárico intrínseco y su activación podría deberse al alza inicial en el NGF (30 días postadministración de valerato de estradiol). Esto porque la desnervación *per se*, a pesar de inducir cambios en el mRNA para p75NTR, al igual que lo encontrado en ovario inmaduro (Lara y cols. 1990a), no favorece la síntesis de mRNA para NGF ni el péptido NGF a los 11-12 días post sección quirúrgica del nervio ovárico superior.

Tenemos así evidencias de que una vez que se ha establecido la condición quística, persisten cambios a nivel del componente neurotrófico NGF/p75NTR. Estos cambios podrían dar cuenta de la activación de componentes celulares ováricos, los que pueden pertenecer a la contraparte intraovárica del sistema nervioso simpático extrínseco y/o a células que forman parte del sistema intraovárico intrínseco independiente de la inervación externa y que participarían en la homeostasis de la NE.

4.3 Participación de las neuronas intraováricas

Los ovarios de ciertos mamíferos poseen neuronas intrínsecas (Dees y cols. 1995; D'Albora y cols. 2000; Anesetti y cols. 2001). Aún no se ha establecido de manera clara su función, pero se ha estimado que podrían participar en conjunto con la inervación simpática en el control de la homeostasis ovárica (Ojeda, Lara 1989a; Ojeda, Lara y Ahmed 1989b; Dissen, Dees y Ojeda 1993).

Teniendo en cuenta que en la condición quística existe activación del

sistema simpático extrínseco (Lara y cols. 1993), es razonable pensar también, que exista participación activa de estas células en la condición quística, como parte del sistema nervioso ovárico intrínseco. Esto porque las células neuronales intrínsecas expresan el receptor p75NTR (D'Albora y cols. 2000; Anesetti y cols. 2001) y podrían, por tanto, ser blanco de las acciones del NGF en relación con la activación nerviosa (Lara y cols. 2002). En esta tesis obtuvimos fuertes evidencias sobre la presencia de neuronas en ovario de rata en las diferentes series experimentales. Si bien no pudimos demostrar cuerpos neuronales por inmunotinción, medimos la concentración de mRNA para TH. La TH es la enzima marcapasos de la síntesis de catecolaminas (Lansing y Lonstein 2005) y el mRNA se encuentra presente solamente a nivel del cuerpo celular. Una de las observaciones importantes se obtuvo en los animales SONX. En éstos existe un alza en el mRNA para TH, indicando que las neuronas son capaces de reconocer cambios en la homeostasis neuronal ovárica. Este tipo de regulación trans-sináptica se ha descrito en otra estructura con inervación simpática, como el bulbo olfatorio (Winner y cols. 2006). El hecho que en condiciones normales la concentración del mRNA para TH sea menor significa que la inervación simpática ejercería un control negativo sobre las neuronas intraováricas y ante la ausencia del componente externo, éstas se activan supliendo parcialmente las funciones de éste. Sin embargo en la condición quística la situación parece ser diferente, el patrón de síntesis de este mRNA no supone la participación activa de las neuronas en esta situación, ya que no se observan cambios en el contenido de mRNA en animales EV ni en animales EV SONX con respecto al control. Probablemente el aumento de NGF, previo a la aparición de los quistes, activa a las neuronas presentes (Lara y cols. 2002), de manera que una vez que se ha establecido la condición quística, las neuronas ya están activadas y, por lo tanto no se necesitaría un aporte adicional, no visualizándose un aumento en el mRNA TH. Existe la posibilidad también, que estas neuronas sean refractarias a los cambios

generados durante la condición quística. Lo más probable, sin embargo, es que esto se deba a inhibición de la actividad TH por efecto de retroalimentación negativa ejercida por la NE (Weiner 1970), cuyo contenido está aumentado en la condición poliquística y disminuye sólo a niveles de control no desnervado al seccionar el nervio ovárico superior. En los animales EV SONX debido a la ventana de tiempo de estudio y al hecho de que sólo existe una disminución parcial en el contenido de NE, puede no ser suficiente para gatillar cambios en el contenido del mRNA para TH.

Por su parte el estradiol también puede afectar negativamente la actividad de TH. Este esteroide está aumentado en la condición quística (Brawer y cols. 1978; Barría y cols. 1993) y en sistema nervioso central se ha visto que inhibe tanto la actividad de TH como la síntesis de su mRNA (Blum, McEwen y Roberts 1987). Sin embargo esto no es del todo claro en el ovario, ya que los animales EV SONX presentan niveles plasmáticos y de secreción de estradiol similares a los animales control (Barría y cols. 1993; Rosa e Silva y cols. 2003) y su concentración de mRNA para TH es similar a la de la condición quística. Habría que determinar el nivel de estradiol en los animales SONX, para ver si existe correlación entre el alza del mRNA para TH y los niveles presentes de este esteroide.

Los estudios de inmunohistoquímica para demostrar la presencia de neuronas positivas para TH en las diferentes muestras experimentales, tampoco evidenciaron la existencia de un número importante de células que pudiesen ser neuronas TH positivas. Quizás esto se debió a aspectos técnicos aún no resueltos por nosotros, ya que si bien la población de neuronas es pequeña y probablemente no es gravitante en el control de la función ovárica normal, ésta ha sido demostrada previamente en ovario de rata (D'Albora y Barcia 1996; D'Albora, Lombide y Ojeda 2000).

Teniendo en consideración: a) que la densidad de esta inervación es baja, b) que no aparecen cambios en el mRNA para TH asociados con la aparición de

quistes ováricos y c) que efectivamente hay un aumento en la actividad secretora de NE dependiente de la aparición de quistes ováricos (ver adelante), es que pensamos que las neuronas intraováricas, aunque pueden formar parte del sistema nervioso ovárico intrínseco, no participan de manera activa en la condición quística y serían otros los grupos celulares responsables de la mantención de la alta actividad nerviosa simpática observada en esta condición. Las observaciones sobre los cambios en la concentración de mRNAs para NGF, p75NTR y TH han sido publicados recientemente en *Endocrine* 2005, 28:319-24.

4.4 Presencia del transportador de Dopamina en células ováricas.

Tomando en consideración lo señalado anteriormente sobre la discreta participación de las neuronas ováricas intrínsecas en la condición quística, abordamos la literatura y encontramos que, como se ha señalado anteriormente, además de las neuronas intrínsecas, existen variados tipos celulares no neuronales con actividad catecolaminérgica que podrían formar parte del componente intrínseco (Shrivastava 1974; Thakur 1975; Gupta, Thakur, Wrutniak-Zolnowska 1980; Huang y cols. 1996, Mezey y cols. 1996). Tal es el caso, también, de los ovocitos (Mayerhofer y cols. 1998). En mono se ha observado que estas células son capaces de sintetizar NE, ya que poseen la enzima dopamina β -hidroxilasa la que cataliza el paso de DA a NE. Estos ovocitos no poseen ni mRNA ni proteína TH, indicando que son incapaces de sintetizar DA, sin embargo, expresan DAT, el que presenta idéntica homología con el de cerebro humano. La existencia de este transportador sugiere que la internalización de DA es por esta vía.

Se plantea así la posibilidad de que existan otros tipos celulares en el componente interno del ovario, que sean físicamente independientes de la inervación extrínseca y que, sin ser neuronas propiamente tal, sean capaces de controlar los niveles locales de NE. Uno de los elementos importantes en este

control -como se ejemplificó anteriormente- serían los transportadores de catecolaminas, los que podrían internalizar NE o algún precursor y liberarlos al medio en respuesta a un estímulo adecuado. Este mecanismo podría explicar en algunos aspectos el aumento sostenido de la liberación de NE en la condición EV.

A nivel del sistema nervioso central, la presencia de un sistema de transporte activo para la recaptura de NE en los terminales nerviosos simpáticos fue sugerida inicialmente mediante experimentos que evaluaban la recaptura y retención de ³HNE administrada intravenosamente en animales (Whitby y cols. 1961). Esta recaptura es prevenida mediante simpatectomía (Whitby y cols. 1961) y también bloqueada mediante el uso de sicotrópicos, entre los que destacan antidepresivos tricíclicos y la cocaína (Axelrod y cols. 1961). En el ovario se ha comprobado que la incorporación de ³HNE y la liberación de NE recién incorporada tienen un origen neuronal (Lara y Belmar 1991a). En el sistema nervioso central la NE es incorporada mayoritariamente en los terminales nerviosos por acción de NET, aunque se ha observado que DAT también posee esta capacidad, pero con una constante de afinidad menor (Eisenhofer 2001). En el ovario no existen estudios sobre el tipo de transportador de catecolaminas que está participando en el proceso de recaptura de NE, tanto en los terminales nerviosos extrínsecos, como en las células del sistema nervioso intrínseco que actuarían conjuntamente en el control de la función ovárica.

En este trabajo, mediante el uso de anticuerpos específicos en cortes de tejido de ovario, se observó claramente la presencia de DAT en células de granulosa en todas las series experimentales. Existe marca también, aunque más discreta, en células lúteas e intersticiales en todos los grupos de animales. Por el contrario, NET no se detectó de manera importante en ningún tipo de estructura intragonadal. La presencia de DAT en las diferentes estructuras señaladas y en todas las series experimentales, sin que exista diferencia

aparente en la cantidad de marca entre estas series, salvo la relacionada con la presencia o ausencia del tipo celular, hace suponer que este transportador puede estar participando de manera general en la homeostasis de catecolaminas dentro del ovario. De esta forma la NE procedente de los terminales nerviosos simpáticos, de fuentes intraováricas o del trazador radiactivo ^3HNE , podrían entrar a las células y ser liberado desde el mismo, dependiendo, por ejemplo, de cambios en los potenciales de membrana, como los que ocurren en el fenómeno de transporte reverso (Kitayama y Sogawa 2005). Este mecanismo se estaría comportando como una especie de tampón fisiológico, que permitiría un mejor control de la concentración de las catecolaminas intraováricas.

Existe una importante inmunorreactividad para DAT en las células de la granulosa. La presencia de este transportador en este tipo celular podría verse favorecida por la presencia de NGF en el medio ovárico. Experimentos en cultivo de células PC12 muestran que en presencia de NGF las células refuerzan su capacidad de incorporar DA y que la cantidad de mRNA para DAT es baja en ausencia de NGF y alta si éste se encuentra presente en el medio de cultivo (Kadota y cols 1996). Esta correspondencia entre el aumento de NGF y el aumento en el mRNA para DAT no se observó directamente en las series experimentales evaluadas. Probablemente porque a los 60 días post valerato de estradiol ya ocurrió el alza en NGF. Sin embargo, el patrón del mRNA para DAT denota que existe una comunicación entre la inervación simpática y el componente intrínseco que hace que al no existir el control simpático, las células del componente intrínseco aumenten su contenido de transcrito para DAT como mecanismo compensatorio ante la pérdida del control externo. En la condición quística y en animales EV SONX, que ya poseen un aumento en la actividad nerviosa simpática, probablemente ocurra lo mismo que con el transcrito para TH. El sistema está previamente activado, de manera que no responde, mediante un alza en el mRNA para DAT, ante la pérdida del control

externo.

La presencia de DAT en las células de la granulosa y en otros tipos celulares, que derivan de ella, como los cuerpos lúteos, plantea que estas células serían, al menos, uno de los componentes del sistema nervioso ovárico intrínseco que están participando, junto con el sistema simpático extrínseco, en el control nervioso normal de la función ovárica. Además, se insinúa que estas células podrían participar en eventos fisiológicos distintos de la síntesis y secreción de esteroides ováricos. En la condición quística, el aumento de NGF previo a la aparición de los quistes, podría ser el nexó molecular que intensifique la actividad de las granulosas, de manera que se mantenga la hiperactividad nerviosa característica de la condición. La relevancia fisiológica de las mismas será discutida más adelante.

4.5 Fuentes de NE intraovárica

Como se ha señalado anteriormente, la hiperactividad nerviosa ovárica se expresa en un aumento en la concentración de NE ovárica. La NE presente en el ovario podría tener otra fuente de origen, además de la inervación simpática extrínseca. Creemos que las neuronas presentes en el ovario no participan de manera activa en la condición quística, es decir no contribuyen al aumento en la actividad catecolaminérgica, pero sin embargo, pueden ser una fuente intrínseca pasiva de NE, tanto en condiciones quísticas como normales, situación que se ha observado en ovario de mono (Dees y cols. 1995). Se ha establecido además, la presencia de otros tipos celulares que podrían participar de manera activa. En ovario de rata se han descrito células cromafines que contienen DA y NE (Fortak, Kmiec y Wrutniak-Żołnowska 1979). Estas células presentan variaciones en el contenido de gránulos cromafines y vacuolas, que tienen directa relación con los diferentes estados del ciclo estral (Wrutniak-Żołnowska 1980). En variadas especies de peces (Gupta, Thakur y Shrivastava 1974; Thakur 1975), la localización y posibles variaciones de tamaño durante el

ciclo reproductivo del ovario sugiere que participan en el crecimiento y maduración de los ovocitos. También se han identificado sistemas adrenérgicos intrínsecos en corazón (Huang y cols. 1996) y células no-neuronales productoras de dopamina en el páncreas exocrino (Mezey y cols. 1996). Como se mencionó anteriormente, otra fuente de catecolaminas intraováricas está dada por los ovocitos, que son capaces de sintetizar NE a partir de DA, la que es incorporada desde el líquido folicular a través de DAT (Mayerhofer y cols. 1998).

La existencia de fuentes intrínsecas de síntesis de catecolaminas a nivel ovárico refuerza la idea de un sistema inherente al ovario que participe en el control nervioso de la función gonadal.

La presencia del transportador DAT en las células de la granulosa sugiere que, además de funcionar como un posible regulador de la NE intraovárica, las granulosa también podrían ser una fuente intraovárica de NE. Podrían por tanto pertenecer al grupo de células llamadas APUD (*amine precursor uptake and decarboxylation*). Estas fueron descritas primeramente por Pearse en 1966 y son consideradas como “el sistema endocrino difuso... la tercera rama del sistema nervioso, que actuando con el sistema nervioso autonómico, participan en el control de órganos intestinales y poseen un origen embrionario común (neuroectodermo)” (Boyd 2001). Las células C de la tiroides, células neuroendocrinas pulmonares y gastrointestinales y los islotes pancreáticos de Langerhans, corresponderían a este tipo de células (Ortega, Lorente y Salvetti 2004). Además recientemente, datos experimentales muestran que las células de Leydig de roedores, presentan marcadores neuronales, que en conjunto con su clásica actividad endocrina, sugiere que podrían corresponder a este tipo de células (Ortega, Lorente y Salvetti 2004). Las células de la granulosa podrían poseer estas mismas características y función, comportándose como células endocrinas y nerviosas a la vez.

La presencia de DAT en estas células sugiere que serían un participante activo

en el sistema nervioso ovárico intrínseco y que podrían controlar la homeostasis de la NE, ya sea a nivel de la producción y/o almacenamiento y/o liberación de la misma.

4.6 Participación del sistema nervioso intrínseco en la liberación de NE en la condición quística

Como se ha señalado anteriormente, existen evidencias moleculares (cambio en el balance molecular del complejo neurotrófico NGF/p75NTR) y celulares (inmunorreactividad para DAT) de la existencia de estructuras intraováricas que podrían contribuir de manera activa a la regulación de los niveles de NE en el ovario, tanto en condiciones normales, pero de sobremanera en condiciones patológicas, como es durante la presencia de quistes ováricos.

Desde hace un tiempo se ha establecido claramente la activación del componente nervioso simpático en la condición quística en modelo de rata (Lara y cols. 1993). Esto se refleja en un aumento en la actividad de TH en el ganglio celíaco (último relevo sináptico de la inervación simpática ovárica) y en el ovario, en un mayor contenido de NE, mayor porcentaje de incorporación de NE y aumento en el porcentaje de liberación fraccional de NE.

Nuestros datos se correlacionan muy bien con lo anterior: en la condición quística existe una mayor liberación de ³HNE recién incorporada y un aumento del contenido de NE. Por su parte al desnervar animales control, el porcentaje de liberación fraccional y la concentración de NE disminuyen, indicando que el componente nervioso simpático extrínseco es un elemento importante en el control nervioso ovárico. La concentración de NE disminuye más que lo que disminuye la liberación, esto plantea que existen células que no poseen la capacidad de síntesis y almacenamiento, pero que podrían incorporar y liberar NE bajo un estímulo apropiado.

Esto hace suponer que, además de las fibras simpáticas asociadas al plexo

nervioso, dentro del ovario existiría una población de células, que es funcional desde el punto de vista de la liberación e independiente de la inervación simpática. Nuevamente y, ahora, desde un punto de vista fisiológico se plantea la existencia de un sistema nervioso ovárico intrínseco, que podría tener un papel importante como regulador de la concentración intraovárica de NE.

Más aún, en los animales con quistes a los cuales se les eliminó la inervación extrínseca, se observó que la liberación de NE es similar a los valores de los animales control no desnervados. Esto es indicativo de que en la situación quística, el sistema nervioso ovárico intrínseco también está activado y podría seguir funcionando a niveles del animal control, pero sin el control externo del sistema simpático. De esta forma, en los animales EV SONX, el sistema intrínseco estaría supliendo la falta del sistema extrínseco, siendo capaz de mantener los niveles de NE en condiciones similares a las de los animales control. De ahí que se plantea la posibilidad que el sistema intrínseco pueda ser un componente fisiológico importante en la mantención de la actividad nerviosa que permite la perpetuación de la condición quística.

Lo observado en la liberación de NE representa de forma general lo que ocurre con la concentración de NE intraovárica, donde los valores de NE disminuyen con respecto al control en la condición SONX, son mayores en la condición quística y decaen a niveles control en los animales EV SONX. Esto refuerza la idea de un compromiso general no tan sólo de las proyecciones nerviosas extrínsecas del ovario, sino también de las células internas involucradas en la síntesis y liberación de NE, en el control de la función ovárica en condiciones normales y patológicas.

Como se ha señalado anteriormente, en mujeres con ovario poliquístico se ha observado una mayor profusión de nervios catecolaminérgicos (Semenova 1969). La probable existencia de este sistema intrínseco en ovarios humanos, podría explicar en parte también la perpetuación de este síndrome en el tiempo.

El hecho que cuando se seccionan los nervios extrínsecos en la condición

quística, la capacidad de liberación del ovario sólo se atenúe hasta los niveles de animales control, indica que, eventualmente podría existir una suerte de independización por parte de este sistema intrínseco de la inervación simpática, que hiciese que el ovario esté bajo un control tónico aumentado del sistema nervioso intrínseco, aunque la activación simpática extrínseca haya cesado.

Esta sería una observación fundamental ya que, de existir una participación importante del sistema nervioso autonómico en la mantención del ovario poliquístico, se explicaría la perpetuación de esta condición en mujeres que han tenido un compromiso nervioso sistémico inicial, pero que aunque han logrado superar este evento, continúan presentando una condición poliquística (Treasure 1985).

El que un componente celular ovárico intrínseco participe activamente en la condición poliquística generada con valerato de estradiol, podría explicar datos de nuestro laboratorio (Lara y cols. 2002) que muestran que la pulsatilidad que presenta la liberación de NE en animales control se pierde, transformándose en una liberación de una magnitud mayor pero carente de la pulsatilidad característica de todos los sistemas neuroendocrinos en los cuales existe control por las gonadotrofinas. Así mismo y dada la estrecha relación entre la secreción de NE, activación β -adrenérgica y secreción de andrógenos (Barría y cols. 1993) éste podría influir en el aumento en la síntesis de andrógenos ováricos en esta situación. La NE favorece la respuesta de las células esteroideogénicas a las gonadotrofinas (Aguado, Petrović y Ojeda 1984; Hernández y cols 1988;) y en la condición quística está aumentado el nivel de andrógenos (Vaitukatis 1983; Yen 1989).

Los datos aquí presentados refuerzan el concepto de que en la condición quística, la activación de la inervación simpática extrínseca es un factor fundamental y muestran, además, que esto va acompañado de la activación de un componente nervioso intrínseco. Se describe así la existencia de un circuito nervioso ovárico compuesto por la parte extrínseca e intrínseca, que puede

actuar de manera concertada e independiente y puede ser muy importante en la perpetuación de la patología.

4.7 Participación del transportador DAT en el componente nervioso ovárico intrínseco

Una vez establecida la participación de un componente nervioso intrínseco en el aumento de liberación de NE en la condición de ovario poliquístico, se hizo necesaria la evaluación de la participación de DAT en el mismo. Esto porque creemos que a vista de los resultados de localización por inmunohistoquímica, DAT puede ser un constituyente activo en la mantención de la secreción de NE en condiciones normales y probablemente en la condición quística.

Mayoritariamente la NE es recapturada en los terminales nerviosos mediante NET, pero DAT también posee afinidad por NE (Eisenhofer 2001) y creemos que este puede ser uno de los mecanismos mediante los cuales se regula la homeostasis de NE dentro del ovario.

En los ensayos en corte de tejido se muestra que las células de la granulosa son el sitio preferencial para la localización de DAT. La proteína se ubica en células de la granulosa de folículos pequeños y preovulatorios y disminuye en los cuerpos lúteos. Esto sería indicativo de que las granulosas podrían ser uno de los tipos celulares pertenecientes al componente nervioso intrínseco en el ovario. La presencia de un transportador activo en la membrana de estas células podría explicar la vía mediante la cual éstas pueden incorporar NE desde el medio extracelular. Las células de la granulosa no se encuentran innervadas, pero la salida de NE desde estas células podría deberse a otros fenómenos fisiológicos, como el que ocurre con la secreción de acetilcolina en estas células (Mayerhofer y Kunz 2005) y el transporte reverso mencionado anteriormente (Kitayama y Sogawa 2005),

Una de las estrategias experimentales que existen para demostrar la

actividad biológica de alguna proteína, consiste en el uso de bloqueadores farmacológicos de esta actividad. En el caso de DAT, la cocaína es un bloqueador selectivo que impide la incorporación de DA y NE hacia el citoplasma, mediante la inhibición de DAT (Ritz y cols. 1987) y de NET (Freeman, Rice y Riley 2005).

En nuestro laboratorio existen datos experimentales que muestran que la cocaína es capaz de disminuir la incorporación de ^3HNE en glándula mamaria de rata (Donoso, Lara y Sapag 1992), aunque no se ha caracterizado el transportador que sería bloqueado en esta situación. En el caso del ovario, considerando los resultados de la inmunohistoquímica, creemos que si el transportador DAT presente en los distintos tipos celulares, es biológicamente activo, la incorporación de ^3HNE en ovarios incubados previamente con cocaína debiese disminuir, considerando la capacidad de NE de ser reincorporada a través de DAT (Eisenhofer 2001).

De manera general, la incorporación de ^3HNE es un parámetro que da cuenta de la concentración de terminales nerviosos y de estructuras nerviosas noradrenérgicas presentes en determinado tejido u órgano. En esta tesis encontramos, que en el ovario, el patrón de incorporación varió entre las distintas condiciones experimentales estudiadas. La incorporación de ^3HNE disminuye en animales desnervados control, evidenciando una pérdida de tejidos nerviosos adrenérgicos. Por el contrario, en la situación quística la incorporación del marcador radiactivo fue significativamente mayor con respecto a la situación control, pero curiosamente no disminuyó al desnervar los animales con quistes. Esto indica que a pesar de que el componente simpático extrínseco está ausente, dentro del ovario hay estructuras activas - no neuronales - que son capaces de incorporar ^3HNE .

La disminución en la incorporación de ^3HNE observada al usar cocaína como bloqueador selectivo de DAT, indicó que este es un transportador presente en las estructuras que incorporan NE. No hay que dejar de considerar,

sin embargo, que la cocaína puede estar actuando a través de la inhibición de NET (Freeman y cols. 2005), a pesar que de acuerdo a resultados preliminares obtenidos en este trabajo, este transportador se encuentra poco representado en las estructuras ovárica. El perfil de incorporación de ^3HNE es el mismo que en la situación sin cocaína, a excepción de los animales EV SONX, que ahora sí disminuyen su capacidad de incorporar NE en relación a los animales EV. La menor incorporación indica que en la condición quística, el sistema nervioso intrínseco participa activamente incorporando NE probablemente a través de DAT y que debido a la mayor magnitud de la incorporación del sistema extrínseco, no se evidencia su participación hasta que este último es eliminado. La capacidad de incorporación de NE a través de DAT puede verse influenciada en la condición quística por efecto estrogénico, como se ha visto que ocurre en cerebro de pacientes con terapia de reposición hormonal, en los que la presencia de DAT está aumentada en el putamen (Gardiner y cols. 2004).

Las evidencias que encontramos sobre la localización preferencial de DAT en las células granulosas y su participación en la incorporación de NE, nos hace postular que estas células serían parte importante del sistema nervioso ovárico intrínseco y que participarían activamente en la incorporación de NE. Esto pudimos comprobarlo, aprovechando la facilidad con la cual se puede separar las células de la granulosa de los folículos ováricos (Lara y cols. 1993) los que nos permitió diseñar experimentos de liberación de ^3HNE incorporada a células de la granulosa y observar que ante un estímulo despolarizante con potasio alto, las células son capaces de liberar ^3HNE . Esto es indicativo de que las células de la granulosa tienen la capacidad de funcionar –tal como se ha demostrado para la acetilcolina (Mayerhofer y Kunz 2005)- como una célula nerviosa, además de sus clásicas características endocrinas.

Esto abre una nueva ventana para el estudio de las diferentes propiedades que tienen éstas células y la regulación que puedan estar ejerciendo sobre el ovocito y el ovario en su totalidad.

4.8 Proyecciones hacia la patología humana

Desde hace un tiempo, tanto desde el punto de vista experimental como clínico, existen resultados que apuntan a que la etiología y/o mantención del SOP, estaría fuertemente relacionada con el sistema nervioso simpático. Ejemplo de esto es que en humanos se ha observado experimentalmente, mediante histofluorescencia (Semenova 1969) e inmunohistoquímica (Heider, Pedal y Spanel-Borowski 2001), que los ovarios de pacientes con SOP presentan una profusión de nervios catecolaminérgicos. Por su parte, observaciones clínicas dan cuenta que pacientes SOP resistentes a terapia hormonal recobran la funcionalidad ovárica después de una resección bilateral en cuña de la zona de entrada de los nervios al ovario (Allen 1959; Katz 1978; Vaitukaitis 1983; Nakamura 1990), sugiriendo un compromiso funcional de los nervios simpáticos. En apoyo a esto, observaciones realizadas a mujeres con anorexia nerviosa, una disfunción siconeuroendocrina poco entendida aún, pero en la cual existe una sobreactividad del sistema nervioso simpático, también evidencian el desarrollo de quistes foliculares (Treasure 1985). El compromiso nervioso parece ser importante también en esta patología, ya que las pacientes a pesar de ser tratadas, de haber recuperado el peso adecuado y los niveles normales de gonadotrofinas, continúan en amenorrea y son refractarias a la ovulación en respuesta a LHRH. Así mismo, estudios recientes sobre ansiedad y prevalencia de SOP muestran una relación directa entre estas dos situaciones (Greiner y cols. 2005), indicando, nuevamente, un compromiso del sistema nervioso simpático. Finalmente, los estudios de Stener-Victorin y cols. (Stener-Victorin y cols. 2000; Stener-Victorin y cols. 2003; Manni y cols. 2005) sobre la eficacia de la electroacupuntura como tratamiento alternativo para el SOP, justifican y dan pie a la hipótesis del origen neurogénico del síndrome.

Por otro lado, existen observaciones que muestran que la condición quística es una patología que se mantiene en el tiempo, aunque existan ventanas funcionales en las que ciertos parámetros fisiológicos se optimicen. Es así que

el hiperandrogenismo característico de muchas de las pacientes SOP, prevalece durante el embarazo (Sir-Petermann y cols. 2002), a pesar de un bloqueo central de la función ovárica. De igual manera, durante la lactancia, las mujeres SOP presentan ovarios de mayor tamaño y niveles más altos de androstenediona sérica que las mujeres control (Sir-Petermann y cols. 2001). Esto apunta a que, además de la participación del componente nervioso extrínseco, existe un mal funcionamiento del ambiente intraovárico y a que, aunque se mejoren algunos parámetros, como la anovulación, el SOP –como patología endocrino metabólica- es una patología persistente.

Tomando en consideración lo señalado sugerimos que el SOP es una enfermedad que se perpetúa y que junto con el componente nervioso simpático extrínseco, existen estructuras intraováricas activas que participan conjuntamente en la mantención de la condición quística.

Los resultados experimentales de esta tesis muestran que en ovario de mamífero existe un sistema nervioso ovárico intrínseco en conjunto con la inervación simpática extrínseca. Este sistema que está compuesto, al menos en parte, por las células de la granulosa, participaría de manera activa en la condición quística, incorporando y liberando NE. Es así que puede ser el responsable de la perpetuación de la patología humana una vez que el estímulo nervioso extrínseco se haya normalizado, siendo una fuente interna de NE que actúe de manera independiente de la inervación externa.

El estudio del funcionamiento de este nuevo sistema de control de las catecolaminas ováricas, permitirá un entendimiento más integral del ovario; donde, tanto los componentes endocrinos como los nerviosos actúan concertadamente en la mantención de la homeostasis gonadal. Además se podrán desarrollar nuevas estrategias terapéuticas y farmacológicas para combatir desórdenes patológicos relacionados con el ovario, como es el Síndrome de Ovario Poliquístico. La participación de las células de la granulosa en este sistema de control nervioso, demuestra, nuevamente, la asombrosa

plasticidad de las estructuras biológicas. Estructuras que poseen muchas funciones que desconocemos, que se adaptan a la contingencia y que hacen de los organismos vivos, entes en continuo cambio.

5. CONCLUSIONES

En resumen podemos concluir que en el ovario de rata existen al menos dos compartimentos celulares encargados del control nervioso del funcionamiento gonadal. Estos son el sistema nervioso simpático extrínseco y el sistema nervioso intrínseco. Suponemos, por su parte, que el ovario humano se comporta de manera similar.

La evidencia experimental muestra que:

- a) el sistema intrínseco participa en conjunto con la inervación simpática extrínseca en el manejo de los niveles de NE en condiciones normales,
- b) ambos se activan en respuesta a un estímulo esteroideogénico, siendo actores importantes en la condición poliquística,
- c) el sistema nervioso intrínseco es capaz de funcionar de manera concertada, pero a la vez independiente del sistema extrínseco, lo que creemos lo ubica como importante en la perpetuación de la condición quística y
- d) las células de la granulosa serían uno de los componentes de este sistema nervioso ovárico intrínseco, revelando un nuevo rol para estas células foliculares, clásicamente relacionadas con la síntesis y secreción de esteroides ováricos.

Los hallazgos anteriores pueden ser esquematizados de la siguiente manera:

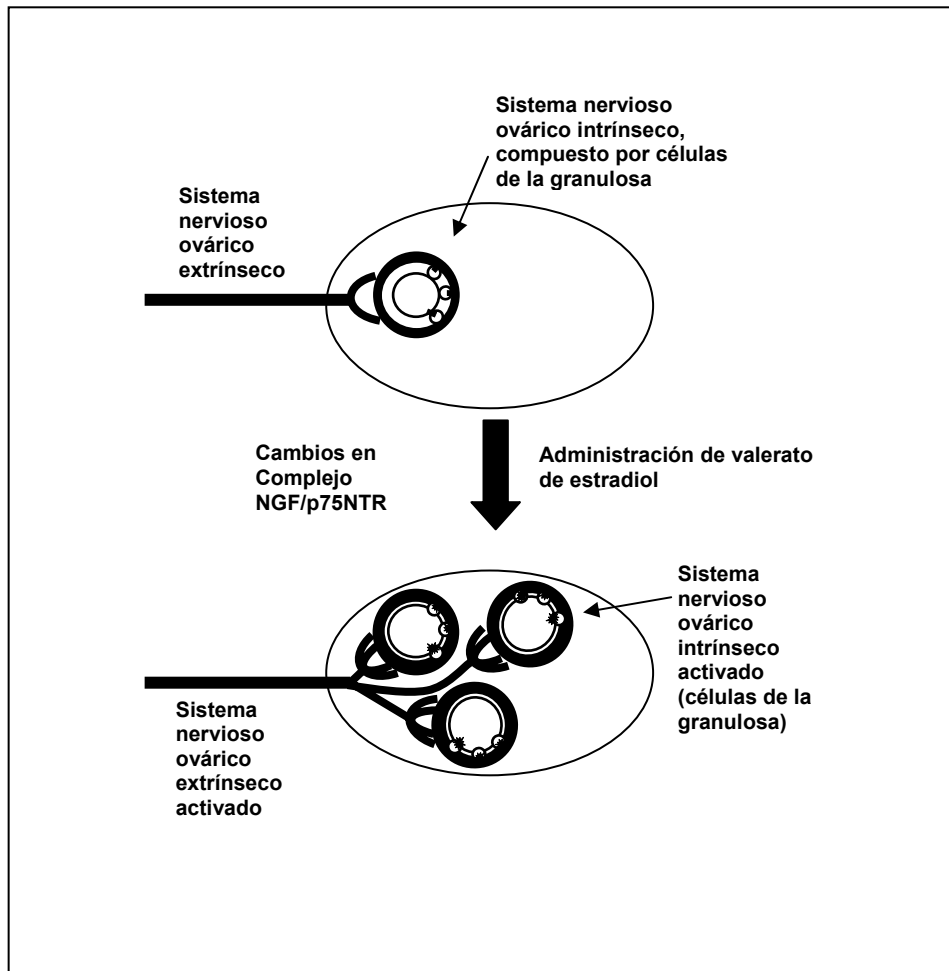


Figura 22: Activación del sistema nervioso ovárico intrínseco.

Los resultados experimentales apuntan a que existe un sistema nervioso ovárico intrínseco que participa de manera conjunta con la inervación simpática extrínseca en la homeostasis de la NE intraovárica. Además se ha observado que en la activación nerviosa presente en la condición quística por efecto del valerato de estradiol, el sistema nervioso ovárico intrínseco también se activa y es capaz de funcionar de manera conjunta pero a la vez independiente de la inervación extrínseca. El sistema nervioso ovárico intrínseco estaría compuesto por células de la granulosa, las que poseen la capacidad de liberar NE recién incorporada. La participación del sistema nervioso intrínseco en la condición quística sería un factor importante en la perpetuación de la condición quística en el tiempo.

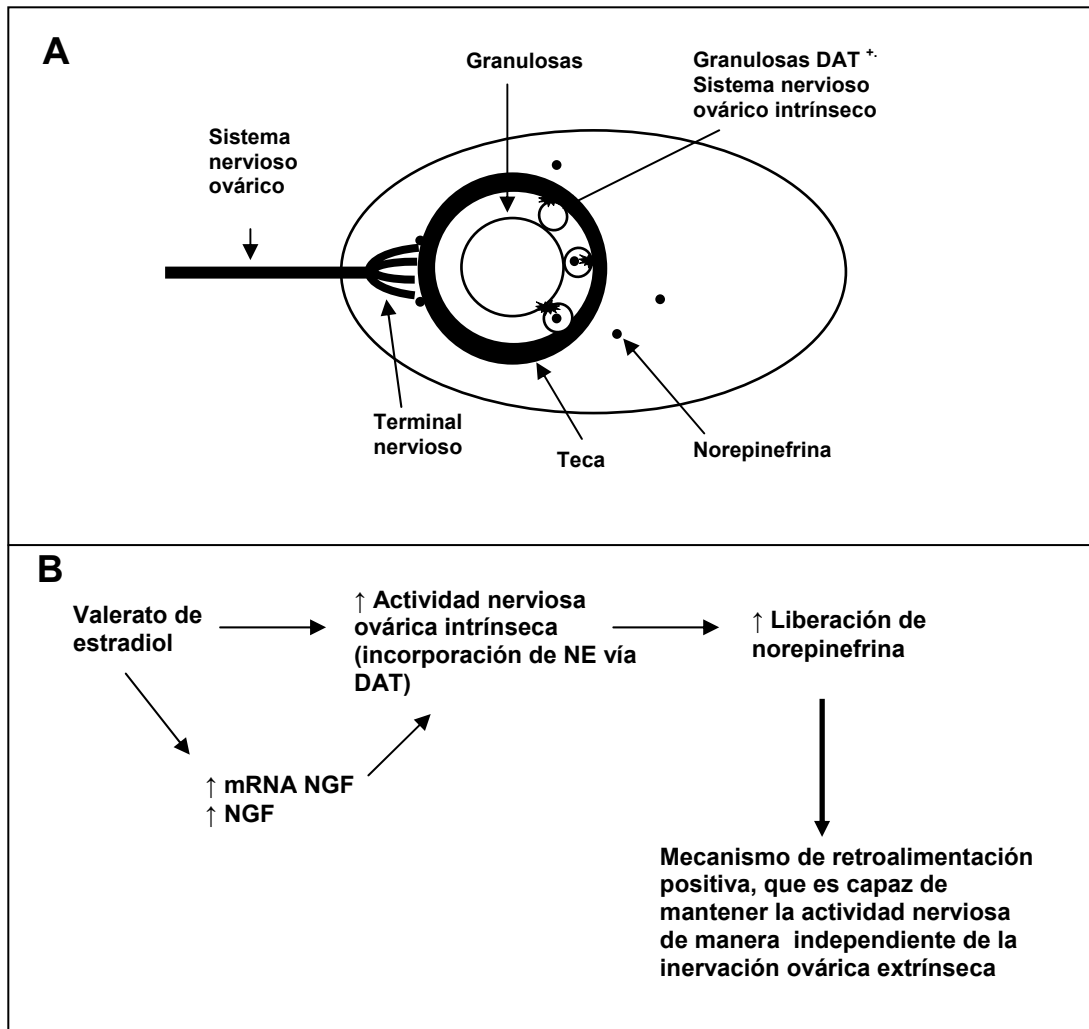


Figura 23: Modelo propuesto del mecanismo de hiperactivación nerviosa en la condición de ovario poliquístico.

En **A** esquematiza el sistema nervioso ovárico intrínseco. Éste estaría compuesto, al menos en parte, por células de la granulosa las que poseen el transportador DAT. La NE que es liberada mayoritariamente por la inervación simpática extrínseca, además de ejercer efectos directos sobre los receptores β -adrenérgicos presentes en las células de la teca, podría ser incorporada y liberada, a través, de DAT en las células de la granulosa en respuesta a estímulos fisiológicos específicos. En la condición quística la activación de este sistema generaría una hiperactividad nerviosa que favorecería la perpetuación de la condición quística en el tiempo, siendo capaz de independizarse del control nervioso simpático. En **B** se esquematizan los eventos secuenciales que estarían dando cuenta de la hiperactividad nerviosa característica de la condición quística.

6. REFERENCIAS

Aguado LI, Petrovic SL, Ojeda SR 1982 Ovarian β -adrenergic receptors during the onset of puberty: characterization, distribution and coupling to steroidogenic responses. *Endocrinology* 110:1124-1132.

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

Allen WM, Woolf RB 1959 Medullary resection of the ovaries in the Stein-Leventhal syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 77:826-37.

Anesetti G, Lombide P, D'Albora H, Ojeda SR 2001 Intrinsic neurons in the human ovary. *Cell Tissue Res* 306:231-237.

Axelrod J, Whitby LG, Hertting G 1961 Effect of psychotropic drugs on the uptake of H³-norepinephrine by tissues. *Science* 133:383-4.

Baljet B, Drukker J 1979 The extrinsic innervation of the abdominal organs in the female rat. *Acta Anat (Basel)* 104:243-67.

Barría A, Leyton V, Ojeda SR, Lara HE 1993 Ovarian steroidal response to gonadotropins and β -adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology* 133:2696-2703.

Blum M, McEwen BS, Roberts JL 1987 Transcriptional analysis of tyrosine hydroxylase gene expression in the tuberoinfundibular dopaminergic neurons of the rat arcuate nucleus after estrogen treatment *J Biol Chem* 262:817-21.

Boyd CA 2001 Amine uptake and peptide hormone secretion: APUD cells in a new landscape *J Physiol* 531(Pt 3):581.

Brawer JR, Naftolin F, Martin J, Sonnenschein C 1978 Effects of a single injection of estradiol valerate on the hypothalamic arcuate nucleus and on reproductive function in the female rat. *Endocrinology* 103:501-1.

Burden HW 1978 Ovarian innervation In Jones RE (ed) *The vertebrate ovary: comparative biology and evolution*. Plenum Press New York 615-638.

Burghen GA, Givens JR, Kitbachi AE 1980 Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulism in polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab* 50:113.

Chao MV, Hempstead BL 1995 p75 and Trk: a two-receptor system. Trends Neurosci 18:321-326.

Chesa PG, Rettig WJ, Thomson TM, Old LJ, Melamed MR 1988 Immunohistochemical analysis of nerve growth factor receptor expression in normal and malignant human tissue. J Histochem Cytochem 36:383-389.

Chomczynski P, Sacchi N 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162:156-9.

D'Albora H, Barcia JJ 1996 Intrinsic neuronal cell bodies in the rat ovary. Neurosci Lett 205:65-67.

D'Albora H, Lombide P, Ojeda SR 2000 Intrinsic neurons in the rat ovary: an immunohistochemical study. Cell Tissue Res 300:47-56.

Dees WL, Ahmed CE, Ojeda SR 1986 Substance P and vasoactive intestinal peptide-containing fibers reach the ovary by independent routes. Endocrinology 119:638-641.

Dees WL, Hiney JK, Schulte TD, Mayerhofer A, Danilchik M, Dissen GA, Ojeda SR 1995 The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuron-like cells expressing nerve growth factors receptors. Endocrinology 136:5760-5768.

Dissen GA, Dees WL, Ojeda SR 1993 Neural and neurotrophic control of ovarian development. In: Adashi EY, Leung PCK (eds) The ovary. Raven Press, New York 1-19.

Dissen GA, Lara HE, Fahrenbach WH, Costa ME, Ojeda SR 1994 Immature rat ovaries become revascularized rapidly after autotransplantation and show a gonadotropin-dependent increase in angiogenic factor gene expression. Endocrinology 134:1146-1154.

Dissen GA, Parrot JA, Skinner MK, Hill DF, Costa ME, Ojeda SR 2000a Direct effects of nerve growth factor on thecal cells from antral ovarian follicles. Endocrinology 141:4736-4750.

Dissen GA, Lara HE, Leyton V, Paredes A, Hill DF, Costa ME, Martínez-Serrano A, Ojeda SR 2000b Intraovarian excess of nerve growth factor increases androgen secretion and disrupts estrous cyclicity in the rat. Endocrinology 141:1073-1082.

Donoso EA, Sapag-Hagar M, Lara HE 1992 Neurochemical evidence for the presence of sympathetic nerve terminals in the rat mammary gland: changes during the lactogenic cycle. *Molec Cell Neurosciences* 3:23-28.

Dorfman M, Arancibia S, Fiedler JL, Lara HE 2003 Chronic intermittent cold stress activates ovarian sympathetic nerves and modifies ovarian follicular development in the rat. *Biol Reprod* 8:2038-43.

Ehrmann DA 2005 Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 352:1223-36.

Eisenhofer G 2001 The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines. *Pharmacol Ther* 91:35-62.

Ferruz J, Barría A, Galleguillos X, Lara HE 1991 Release of norepinephrine from the rat ovary: local modulation of gonadotropins. *Biol Reprod* 45:592-7.

Ferruz J, Ahmed CE, Ojeda SR, Lara HE 1992 Norepinephrine release in the immature ovary is regulated by autoreceptors and neuropeptide-Y. *Endocrinology* 130:1345-51.

Fortak W, Kmieć B, Wrutniak-Żołnowska T 1979 The occurrence of chromaffin cells in the ovaries of female white rat. *Folia Morphol (Warsz)* 38:473-9.

Gálvez A, Paredes A, Fiedler JL, Venegas M, Lara HE 1999 Effects of adrenalectomy on the stress-induced changes in ovarian sympathetic tone in the rat. *Endocrine* 10:131-135.

Gardiner SA, Morrison MF, Mozley PD, Mozley LH, Brensinger C, Bilker W, Newberg A, Battistini M 2004 Pilot study on the effect of estrogen replacement therapy on brain dopamine transporter availability in healthy, postmenopausal women. *Am J Geriatr Psychiatry* 12:621-30.

Gerendai I, Banczerowski P, Halász B 2005 Innervation of the gonads. *Endocrine* 28:309-318.

Greiner M, Cárdenas S, Parra C, Bravo J, Ávalos AM, Paredes A, Lara HE, Fiedler JL 2001 Adrenalectomy regulates apoptotic-associated genes in the rat hippocampus. *Endocrine* 15:323-333.

Greiner M, Paredes A, Araya V, Lara HE 2005 Role of stress and sympathetic innervation in the development of polycystic ovary syndrome. *Endocrine* 28:319-324.

Gupta OP, Thakur DP, Shrivastava RK 1974 Investigation of the ovarian chromaffin tissue in the fresh water teleost fishes. *Gegenbaurs Morphol Jahrb* 120:881-7.

Hantzopoulos PA, Suri C, Glass DJ, Goldfarb MP, Yancopoulos GD 1994 The low affinity NGF receptor, p75, can collaborate with each of the Trks to potentiate functional responses to the neurotrophins. *Neuron* 13:187-201.

Heider U, Pedal I, Spanel-Borowski K 2001 Increase in nerve fibers and loss of mast cells in polycystic and postmenopausal ovaries. *Fertil Steril* 75:1141-1147.

Hernández ER, Jiménez JL, Payne DW, Adashi EY 1988 Adrenergic regulation of ovarian androgen biosynthesis is mediated via β 2-adrenergic theca-interstitial cell recognition sites. *Endocrinology* 122:1592-1602.

Huang MH, Friend DS, Sunday ME, Singh K, Haley K, Austen KF, Kelly RA, Smith TW 1996 An intrinsic adrenergic system in mammalian heart. *J Clin Invest* 98:1298-1303.

Ibáñez L, Potau N, Ferrer A, Rodriguez-Hierro F, Marcos MV, De Zegher F 2002 Anovulation in eumenorrheic, nonobese adolescent girls born small for gestational age: insulin sensitization induces ovulation, increases lean body mass, and reduces abdominal fat excess, dyslipidemia, and subclinical hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5702-5.

Johnson EM, Taniuchi M, DiStefano PS 1988 Expression and possible function of nerve growth factor receptors on Schwann cells. *Trends Neurosci* 11:299-304.

Kadota T, Yamaai T, Saito Y, Akita Y, Kawashima S, Moroi K, Inagaki N, Kadota K 1996 Expression of dopamine transporter at the tips of growing neurites of PC12 cells. *J Histochem Cytochem* 44:989-96.

Katz M, Carr PJ, Cohen BM, Millar RP 1978 Hormonal effects of wedge resection of polycystic ovaries. *Obstet Gynecol* 51:437-44.

Kitayama S, Sogawa C 2005 Regulated expression and function of the somatodendritic catecholamine neurotransmitter transporters. *J Pharmacol Sci* 99:121-7.

Klein CM, Burden HW 1988 Anatomical localization of afferent and

postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neurosci Lett* 85:217-22.

Lansing SW, Lonstein JS 2006 Tyrosine hydroxylase-synthesizing cells in the hypothalamus of prairie voles (*Microtus ochrogaster*): Sex differences in the anteroventral periventricular preoptic area and effects of adult gonadectomy or neonatal gonadal hormones. *J Neurobiol* 66:197-204.

Lara HE, Hill DF, Katz KH, Ojeda SR 1990a The gene encoding nerve growth factor is expressed in the immature rat ovary: effect of denervation and hormonal treatment. *Endocrinology* 126: 357-363.

Lara HE, McDonald JK, Ahmed CE, Ojeda SR 1990b Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and function. *Endocrinology* 127:2199-2209.

Lara HE, McDonald JK, Ojeda SR 1990c Involvement of nerve growth factor in female sexual development. *Endocrinology* 126:364-375.

Lara HE, Belmar J 1991a Release of norepinephrine from the cat ovary: changes after ovulation. *Biol Reprod* 44:752-9.

Lara HE, Dees WL, Hiney JK, Dissen GA, Rivier C, Ojeda SR 1991b Functional recovery of the developing rat ovary after transplantation: contribution of the extrinsic innervation. *Endocrinology* 129:1849-1860.

Lara HE, Ferruz S, Luza SM, Bustamante AD, Borges Y, Ojeda SR 1993 Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 133:2690-2695.

Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL, Ojeda SR 2000 An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of the steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology* 141:1059-1072.

Lara HE, Dorfman M, Venegas M, Luza SM, Luna SL, Mayerhofer A, Guimaraes MA, Rosa 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.

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

Lobo RA, Carmina E 2000 The importance of diagnosing the polycystic ovary syndrome. *Ann Intern Med* 132:989-93.

Manni L, Lundeberg T, Holmang A, Aloe L, Stener-Victorin E 2005. Effect of electro-acupuncture on ovarian expression of alpha (1)- and beta (2)-adrenoceptors, and p75 neurotrophin receptors in rats with steroid-induced polycystic ovaries. *Reprod Biol Endocrinol* 3:21.

Mayerhofer A, Smith GD, Danilchik M, Levine JE, Wolf DP, Dissen GA, Ojeda SR 1998 Oocytes are a source of catecholamines in the primate ovary: evidence for a cell-cell regulatory loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10990-10995.

Mayerhofer A, Kunz L 2005 A non-neuronal cholinergic system of the ovarian follicle. *Ann Anat* 187:521-8.

Mc Donald JK, Dess WL, Ahmed CE, Noe BD, Ojeda SR 1987 Biochemical and immunocytochemical characterization of neuropeptide Y in the immature rat ovary. *Endocrinology* 120:1703-1710.

Mezey E, Eisenhofer G, Harta G, Hansson S, Gould L, Hunyady B, Hoffman BJ 1996 A novel nonneuronal catecholaminergic system: exocrine pancreas synthesizes and releases dopamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10377-82.

Nakamura Y 1990 Treatment of polycystic ovary syndrome: an overview. *Horm Res* 33(Suppl 2):31.

Norman RJ 2002 Hyperandrogenaemia and the ovary. *Mol Cell Endocrinol* 191:113-9.

Norman RJ, Wu R, Stankiewicz MT 2004 4: Polycystic ovary syndrome. *Med J Aust* 180:132-137.

Ojeda SR, Lara HE 1989a Role of the sympathetic nervous system in the regulation of ovarian function. In: Pirke KM, Wuttke W, Schweiger U (eds) *The menstrual cycle and its disorders*. Springer-Verlag, Berlin, pp26-32.

Ojeda SR, Lara HE, Ahmed CE 1989b Potential relevance of vasoactive intestinal peptide to ovarian physiology. *Semin Reprod Endocrinol* 7:52-60.

Ortega HH, Lorente JA, Salvetti NR 2004 Immunohistochemical study of intermediate filaments and neuroendocrine marker expression in Leydig cells of laboratory rodents. *Anat Histol Embryol* 33:309-15.

Paredes A, Gálvez 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.

Ritz MC, Lamb RJ, Goldberg SR, Kuhar MJ. 1987 Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science* 237:1219-23.

Rosa e Silva A, Guimaraes MA, Padmanabhan V, Lara HE 2003 Prepubertal administration of estradiol valerate disrupts cyclicity and leads to cystic ovarian morphology during adult life in the rat: role of sympathetic innervation. *Endocrinology* 144:4289-97.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T 1989 *Molecular cloning: a laboratory manual* 2nd edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

Schultea TD, Dess WL, Ojeda SR 1992 Postnatal development of sympathetic and sensory innervation of the rhesus monkey ovary. *Biol Reprod* 47:760-767.

Semenova II 1969 Adrenergic innervation of the ovaries in the presence of the Stein-Leventhal syndrome. *Vestnik Akademi Meditsinskikh Nauk SSSR* 24:83-88.

Sheehan MT 2004 Polycystic ovarian syndrome: diagnosis and management. *Clin Med Res* 2:13-27.

Shrivastava RK, Thakur DP 1974 Histochemical evidence for the existence of adreno-melanogenic tissue in the teleost fish *Nandus*. *Acta Histochem* 48:42-50.

Sir-Petermann T, Devoto L, Maliqueo M, Peirano P, Recabarren SE, Wildt L 2001 Resumption of ovarian function during lactational amenorrhoea in breastfeeding women with polycystic ovarian syndrome: endocrine aspects. *Hum Reprod* 16:1603-10.

Sir-Petermann T, Maliqueo M, Angel B, Lara HE, Perez-Bravo F, Recabarren SE 2002 . Maternal serum androgens in pregnant women with polycystic ovarian syndrome: possible implications in prenatal androgenization. *Hum Reprod* 17:2573-9.

Stener-Victorin E, Lundeberg T, Waldenstrom U, Manni L, Aloe L, Gunnarsson S, Janson PO 2000 Effects of electro-acupuncture on nerve growth factor and ovarian morphology in rats with experimentally induced polycystic ovaries. *Biol Reprod* 63:1497-503.

Stener-Victorin E, Lundeberg T, Cajander S, Aloe L, Manni L, Waldenstrom U, Janson PO 2003 Steroid-induced polycystic ovaries in rats: effect of electroacupuncture on concentrations of endothelin-1 and nerve growth factor (NGF), and expression of NGF mRNA in the ovaries, the adrenal glands, and the central nervous system *Reprod Biol Endocrinol* 1:33.

Thakur DP 1975 Hypertrophic changes in the ovarian chromaffin tissue (catechol storing tissue) under the influence of the pituitary and its theoretical implications in the teleost fish, *Nandus nandus*. *Gegenbaurs Morphol Jahrb* 121:239-54.

Treasure JL, Gordon PA, King EA, Wheeler M, Russell GF 1985 Cystic ovaries: a phase of anorexia nervosa. *Lancet* 2:1379-82.

Tsilchorozidou T, Overton C, Conway GS 2004 The pathophysiology of polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 60:1-17.

Vaitukaitis JL 1983 Polycystic ovary syndrome- What is it? *N Engl J Med* 309:1245-1246.

Wakade AR 1980 A maximum contraction and substantial quantities of tritium can be obtained from tetraethylammonium-treated [3H]-noradrenaline preloaded, rat vas deferens in response to a single electrical shock. *Br J Pharmacol* 68:425-36.

Weiner N 1970 Regulation of norepinephrine biosynthesis. *Annu Rev Pharmacol* 10:273-90.

Whitby LG, Axelrod J, Weil-Malherbe H 1961 The fate of H3-norepinephrine in animals. *J Pharmacol Exp Ther* 132:193-201.

Winner B, Geyer M, Couillard-Despres S, Aigner R, Bogdahn U, Aigner L, Kuhn G, Winkler J 2006 Striatal deafferentation increases dopaminergic neurogenesis in the adult olfactory bulb. *Exp Neurol* 197:113-21.

Wrutniak-Żołnowska T 1980 Changes of the secretory activity of ovarian chromaffin cells during the sex cycle of female white rats. *Endokrinologie* 76:279-87.

Yang K, Mu XS, Xue JJ, Perez-Polo JR, Hayes RL 1995 Regional and temporal profiles of c-fos and nerve growth factor mRNA expression in rat brain after lateral cortical impact injury. *J Neurosci Res* 42:571-8.

Yen SSC 1999 In: Reproductive Endocrinology Yen SSC and Jaffe RB (eds)
Saunders: Philadelphia. Chap 17:436-476.