

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



Recuperación de la inervación simpática en ovario de rata en período fértil y subfértil tras interrupción quirúrgica del nervio ovárico superior.

Memoria para optar al título profesional de Bioquímica

Constanza Francisca Alanis Cubillos

Director de Memoria

Dr. Alfonso Paredes V
Lab. de Neurobioquímica
Dpto. Bioquímica y Biol. Molecular

Profesor Patrocinante

Dr. Alfonso Paredes V.
Lab. de Neurobioquímica
Dpto. Bioquímica y Biol. Molecular

Santiago - Chile
Agosto - 2018

**Esta memoria fue financiada por el
Proyecto Fondecyt 1120147**

ÍNDICE GENERAL	Páginas
ÍNDICE GENERAL	III
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ABREVIACIONES	VIII
RESUMEN	IX
SUMMARY	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Inervación simpática del ovario	3
1.2 Función de la noradrenalina en el ovario	6
1.3 Función del factor de crecimiento nervioso en el ovario	8
1.4 Función del estradiol en el ovario	11
1.5 Envejecimiento ovárico	13
1.6 Simpatectomía ovárica	16
Hipótesis	18
Objetivo General	18
Objetivos específicos	18
2. MATERIALES Y MÉTODOS	19
2.1 Animales	19
2.2 Determinación ciclo estral	20
2.3 Sección del nervio ovárico superior	22
2.4 Homogeneización del tejido	22
2.5 Determinación de noradrenalina ovárica	23

2.6 Determinación del factor de crecimiento nervioso	24
2.7 Determinación de estradiol en plasma	24
2.8 Análisis Estadístico	25
3.-RESULTADOS	26
3.1 Peso de los animales y los ovarios	26
3.1.1 Peso de los animales	26
3.1.2 Peso de los ovarios	27
3.2 Ciclicidad estral	28
3.2.1 Ciclicidad de ratas en periodo fértil	29
3.2.2 Ciclicidad de ratas en periodo subfértil	30
3.3 Determinación de noradrenalina en el ovario tras sección del SON	31
3.3.1 Variación contenido noradrenalina en ovario tras sección del SON en ratas en periodo fértil.	31
3.3.2 Variación contenido noradrenalina en el ovario tras sección del SON en ratas en periodo subfértil.	32
3.4 Determinación de NGF en el ovario tras sección del SON	33
3.4.1 Determinación de NGF en el ovario tras sección del SON en ratas en periodo fértil.	33
3.4.2 Determinación de NGF en el ovario tras sección del SON en ratas en periodo subfértil.	34
3.5 Determinación de Estradiol en plasma tras sección del SON	35
3.5.1 Determinación de Estradiol en plasma tras sección del SON en ratas en periodo fértil	35
3.5.2 Determinación de Estradiol en plasma tras sección del SON en ratas en periodo subfértil.	36
4. DISCUSIÓN	38

5. CONCLUSIONES	43
5.1 Conclusiones específicas	43
5.2 Conclusión general	44
6. PROYECCIONES	44
7. BIBLIOGRAFÍA	46
8. ANEXO	53

ÍNDICE DE FIGURAS	Página
Figura 1: Plexo Nervioso Ovárico (OPN) y Nervio Ovárico Superior (SON)	4
Figura 2: Variación de la concentración de NA ovárica tras la sección del nervio ovárico superior	5
Figura 3: Efectos de la NA en el ovario mediados por distintos receptores	7
Figura 4: A: Contenido de NA en el ovario durante el envejecimiento reproductivo en rata. B: Porcentaje de liberación fraccionada de NA en el ovario durante el envejecimiento reproductivo en rata	14
Figura 5: A: Contenido de NGF en el ovario durante el envejecimiento reproductivo en rata. B: Niveles Plasmáticos de Estradiol durante el envejecimiento reproductivo en rata.	15
Figura 6: Citología de un frotis vaginal de rata sin tinción	21
Figura 7: Esquema de un ciclo estral de 4 y 5 días en la rata	22
Figura 8: Comparación del peso de las ratas al momento de la cirugía y de la eutanasia	26
Figura 9: Comparación del peso de los ovarios de las ratas denervadas	27
Figura 10: Porcentaje de la permanencia en las distintas etapas del ciclo estral durante el periodo comprendido entre la cirugía y la eutanasia en ratas en periodo fértil	29
Figura 11: Porcentaje de la permanencia en las distintas etapas del ciclo estral durante el periodo comprendido entre la cirugía y la eutanasia en ratas en periodo subfértil	30
Figura 12: Recuperación del contenido de NA ovárica a los 14 y 28 días después de la sección del SON en ratas en periodo fértil	31
Figura 13: Recuperación del contenido de NA ovárica a los 14 y 28 días después de la sección del SON en ratas en periodo subfértil.	32
Figura 14: Contenido de NGF ovárico a los 14 y 28 días después de la sección del SON en ratas en periodo fértil	33
Figura 15: Contenido de NGF ovárico a los 14 y 28 días después de la sección del SON en ratas en periodo subfértil	34
Figura 16: Contenido de estradiol plasmático a los 14 y 28 días después de la sección del SON en ratas en periodo fértil	35
Figura 17: Contenido de estradiol plasmático a los 14 y 28 días después de la sección del SON en ratas en periodo subfértil	36

Figura 18: Anexo registro ciclo estral ratas en periodo fértil: sham14, sonx14	53
Figura 19: Anexo registro ciclo estral ratas en periodo fértil: sham28, sonx28	54
Figura 20: Anexo registro ciclo estral ratas en periodo subfértil: sham14, sonx14	55
Figura 21: Anexo registro ciclo estral ratas en periodo subfértil: sham28, sonx28	56

ÍNDICE TABLAS

Páginas

Tabla 1: División de los grupos experimentales	20
---	----

ABREVIACIONES

AC: Adenilato ciclasa

CG: Células de granulosa

cAMP: Adenosín monofosfato cíclico

D: Diestro

DHBA: Dihidroxibencilamina

DPBS: Solución salina buffer fosfato Dulbecco

E: Estro

E₂: Estradiol

ERK: Quinasas reguladas por señales extracelulares

FSH: Hormona folículo estimulante

GC: Ganglio celiaco

HPO: Hipotálamo-Pituitaria-Ovario

LH: Hormona luteinizante

NA: Noradrenalina

NGF: Factor de crecimiento nervioso

NTR1: Receptor para neurotrofinas 1

ONP: Plexo nervioso ovárico

P: Proestro

PCA: Ácido perclórico

PCO: Ovario poliquístico

P450: Citocromo P450

P75^{NTR}: Receptor de baja afinidad para neurotrofinas

SEM: Error estándar medio

SNC: Sistema nervioso central

SNA: Sistema nervioso autónomo

SNS: Sistema nervioso simpático

SON: Nervio ovárico superior

SONX: denervación de SON

SOP: Síndrome de ovario poliquístico

TrkA: Receptor para la tropomiosina quinasa A

Resumen

La función del ovario es regulada por dos ejes: El Hipotálamo-Pituitaria-Ovario (HPO) y el Sistema Nervioso Simpático (SNS). Hoy se sabe que la regulación ejercida por el SNS, a través del nervio ovárico superior (SON) es tan importante como la vía endocrina regulada por el eje HPO. Es más, durante el envejecimiento reproductivo y en algunas condiciones patológicas, la vía simpática toma un rol protagónico. En la actualidad, la mujer posterga la maternidad hacia el periodo de subfertilidad lo que hace necesario investigar los procesos que ocurren a nivel local en el ovario durante este periodo con el propósito de aumentar el éxito de los programas de fertilización *in vitro* y/o bien retrasar el inicio de la subfertilidad.

En el periodo de subfertilidad la actividad del SNS se encuentra espontáneamente aumentada, lo que se ha correlacionado con alteraciones en el desarrollo folicular y disminución de la fertilidad. En estudios en modelo de rata fértil, donde se induce un aumento de la actividad simpática, se ha demostrado que se altera la funcionalidad ovárica y que la simpatectomía quirúrgica permite revertir este efecto. Por otro lado, se ha demostrado que el ovario de rata fértil, tiene cierta plasticidad, dada por su capacidad de recuperar la inervación a los 28 días después de la simpatectomía. Sin embargo, se desconoce si durante el periodo de subfertilidad (8-12 meses de edad de la rata) el ovario aún conserva esta capacidad. Teniendo en consideración estos antecedentes es que se ha planteado la siguiente hipótesis: “El ovario recupera la inervación simpática después de la simpatectomía bilateral del nervio ovárico superior durante el periodo de subfertilidad de la rata”.

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la recuperación de la inervación simpática en el ovario en ratas de 5 meses (periodo óptimo de fertilidad) y de 9 meses de edad (periodo de subfertilidad), tras la denervación quirúrgica bilateral del SON. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos: 1) Evaluar la recuperación de la inervación simpática mediante la determinación de los niveles de NA y NGF en el ovario a los 14 y 28 días post-simpatectomía, tanto en el período fértil como subfértil y 2) Evaluar la relación entre NGF y E₂ en el proceso

de reinervación mediante la determinación de los niveles séricos del estrógeno a los 14 y 28 días post-simpatectomía del ovario en período fértil y subfértil.

Adicionalmente, se registró el peso y ciclicidad estral de las ratas para evaluar otros posibles efectos de la cirugía.

Los resultados mostraron que la denervación no afectó la ciclicidad estral de la rata ni los niveles séricos de E_2 determinados a los 14 y 28 días post cirugía, en el periodo fértil y subfértil, pero sí hubo variaciones en el contenido de NA y NGF ováricos, aunque de manera diferencial dependiendo del periodo estudiado. A ambas edades, en los grupos sonx14 (14 días post denervación), se observó una disminución importante en el contenido de NA (cerca al 60 %), sin embargo, mientras el grupo sonx28 de 5 meses de edad recuperó el contenido de la catecolamina en torno al 90%, el grupo de 9 meses de edad sólo recuperó el 60%, en comparación a sus respectivos grupos sham. En cuanto a NGF, en las ratas fértiles se observó una tendencia al aumento en el grupo sonx14, mientras que en las ratas subfértil hubo un aumento significativo en el grupo sonx28.

El análisis de los resultados, sugiere que en edad fértil (5-6 meses de edad de la rata), el ovario es capaz de recuperar la inervación y que el proceso tomaría alrededor de 28 días, pero durante el periodo subfértil (9-10 meses de edad de la rata), el ovario responde tardíamente a la denervación, permaneciendo la interrogante de si una eventual reinervación ocurre y en caso de efectuarse si es total o parcial.

SUMMARY

Recovery of the sympathetic innervation in rat ovary in fertile and subfertile period after surgical interruption of the superior ovarian nerve.

The function of the ovary is regulated by two axes: The Hypothalamus-Pituitary-Ovary (HPO) and the Sympathetic Nervous System (SNS). Today, it is known that the regulation exerted by the SNS, through the Superior Ovarian Nerve (SON) is as important as the endocrine pathway regulated by the HPO axis. Moreover, during the reproductive aging and in some pathological conditions, the ovarian sympathetic system takes a protagonist role. Currently, women postpone motherhood to the period of subfertility which makes it necessary to investigate the processes that occur at the local level in the ovary during this period in order to increase the success of *in vitro* fertilization programs and/or delay the onset of subfertility.

In the period of subfertility the activity of the SNS is spontaneously increased, which has been correlated with alterations in the follicular development and decrease in fertility. Studies in fertile rat model, where an increase in sympathetic activity is induced, it has been demonstrated that ovarian functionality is altered and the surgical sympathectomy allows to reverse this effect. On the other hand, it has been shown that the fertile rat ovary has a certain plasticity, given its ability to recover the innervation 28 days after the sympathectomy. However, it is unknown if during the period of subfertility (8-12 months of age of the rat) the ovary still retains this capacity. Taking this background into consideration, the following hypothesis has been stated: "The ovary recovers sympathetic innervation after bilateral sympathectomy of the superior ovarian nerve during the period of subfertility in the rat".

The aim of this work was to evaluate the recovery of sympathetic innervation in the ovary in rats of 5 months old (optimal fertility period) and 9 months old (subfertility period), after bilateral denervation of the SON. For this, the following specific

objectives were proposed: Determine at 14 (sonx14) and 28 (sonx28) days post-sympathectomy: 1) the recovery of sympathetic innervation by determining the levels of NA and NGF in the ovary and, 2) the possible relationship between NGF and E₂ in the reinnervation process by determining the serum levels of the estrogen. Additionally, the weight and cyclicity of the rats were recorded to evaluate other possible effects of the surgery.

The results showed that the denervation did not affect the estrous cyclicity of the rat, nor the plasma levels of Estradiol determined at 14 and 28 days after surgery in the fertile and subfertile periods. But there were variations in the content of NA and NGF ovarian, although differentially depending on the period studied. At both ages, in the groups sonx14 (14 days after denervation), a significant decrease in NA content was observed (close to 60%), however while sonx28 group of 5 months old recovered the content of catecholamine around the 90% , the group of 9 months old only recovered the 60% compared to their respective sham groups . As to NGF in the fertile rats a tendency to increase was observed in the sonx14 group, while in the subfertile rats there was a significant increase in the sonx28 group.

The analysis of the results suggest that in fertile age (5-6 months of age of the rat), the ovary is able to recover the innervation and that the process would take around 28 days, but during the subfertile period (9-10 months of age of the rat), the ovary responds late to the denervation, remaining the question of whether an eventual reinnervation occurs and if is carried out totally or partially.

1.-Introducción

El acceso de la mujer a un mayor nivel educacional y al mundo laboral, tiene como efecto, la postergación de la maternidad hasta después de los 30 años. (Fuentes et al., 2010; Mathews and Hamilton, 2016). Esto resulta inquietante, si consideramos que en términos biológicos, la edad óptima de fertilidad de la mujer se encuentra entre los 18 y 32 años de edad (periodo fértil). Después de los 32 años, la mujer comienza a experimentar una disminución en su fertilidad, hasta alcanzar un punto crítico alrededor de los 37,5 años, momento al que ingresa al denominado periodo de subfertilidad. Durante esta etapa, se acelera la pérdida folicular, y los folículos remanentes (folículos primordiales) en el ovario, presentan una calidad disminuida, lo que se refleja en dificultad para concebir y en caso de lograrlo, se encuentra aumentado el riesgo de abortos espontáneos y/o de anomalías en los fetos (de Mouzon et al., 1990; Tarlatzis et al., 2003; Schmidt et al., 2012; Waldenstrom et al., 2015). Esta condición aumenta exponencialmente después de los 43 años de edad hasta que alrededor de los 51 años, el ovario se vuelve incapaz de responder al control ejercido por el eje hipotalámico y se produce el cese definitivo del desarrollo folicular y de la función ovárica, etapa denominada menopausia (te Velde and Pearson., 2002).

Además de la postergación de la maternidad, existen ciertas patologías, que están aumentando su incidencia, y que aquejan a la mujer, aun cuando se encuentra en el periodo óptimo de fertilidad, dificultando la obtención de un embarazo exitoso. Por ejemplo, el síndrome de ovario poliquístico (SOP), el cual en muchos aspectos, se asemeja a lo observado en el ovario durante el envejecimiento reproductivo (Heider et al., 2001). Una de esas similitudes es el aumento del tono nervioso simpático en el ovario (Lara et al., 1993. Heider et al., 2001; Acuña et al., 2009), que se correlaciona con alteraciones en el desarrollo folicular así como disminución de la fertilidad (Barria et al., 1993).

Entonces, resulta clave, entender cómo ocurre el proceso del envejecimiento ovárico, ya que podría significar hallar la manera de retrasar el período de

subfertilidad o tratar patologías asociadas a una alteración en la función ovárica, como lo es el SOP (Cruz et al., 2017).

Para entender el funcionamiento ovárico y las posibles causas que llevan al envejecimiento del órgano o la aparición de patologías, se precisa de un modelo que sea práctico en términos de trabajo de laboratorio, pero que además, se asemeje en términos biológicos al humano. En este caso, este modelo corresponde a la rata Sprague-Dawley.

De forma similar a lo que ocurre en la mujer, en la rata, se ha establecido un periodo de fertilidad óptimo (entre los 3 y 7 meses de edad), un periodo de subfertilidad (entre los 8 y 12 meses de edad) y pérdida total de la función ovárica (después de los 12 meses de edad) (Cruz et al., 2017). Además, reforzando la idea del uso de la rata como modelo de estudio, en nuestro laboratorio se ha podido observar que el envejecimiento ovárico en el roedor posee características similares al observado en la mujer y aún más, mediante la administración de una dosis única de valerato estradiol se ha podido desarrollar un modelo que replica bastante la fisiopatología del ovario poliquístico (PCO) que en la mujer se observa en la condición del SOP (Lara et al., 1993).

El ovario es el órgano encargado del desarrollo de los gametos femeninos y de la producción de hormonas peptídicas y esteroideas (MacGee et al., 2000; Aguado Luis, 2002), y se encuentra regulado al menos por dos ejes: 1) Eje Hipotálamo-Pituitaria-Ovario (HPO), el cual ha sido ampliamente descrito en la literatura (Toufexis et al., 2014; Uchida Sae., 2015) y el 2) Eje Nervioso, que ha ido tomando relevancia en las últimas décadas. Dentro de lo que concierne a este segundo eje, este trabajo se centra en el sistema nervioso autónomo (SNA), particularmente el sistema nervioso simpático (SNS) (Lawrence and Burden., 1980; Klein and Burden., 1988; Aguado Luis, 2002).

1.1 Inervación Simpática del Ovario

La descripción y análisis completo de las vías nerviosas simpáticas que conectan el ovario con el sistema nervioso central (SNC), y las que permiten la comunicación entre los ovarios, aún se encuentran en proceso de estudio, hablándose incluso de vías asimétricas entre ambos ovarios (Pastelín et al., 2017). Sin embargo, la existencia de una conexión multisináptica entre diferentes centros del SNC y el ovario ha sido demostrada al utilizar marcadores virales retrógrados (Gerendai et al., 1998, 2002), lo que refuerza la idea de una segunda vía de regulación de la gónada paralela al eje HPO. Las fibras simpáticas que inervan el ovario en la rata emergen desde los segmentos inferior torácico y superior lumbar de la médula espinal (T9 y T10 respectivamente) (Burden H.W., 1972; Baljet and Drukker., 1979; Nance et al., 1988; Uchida Sae., 2015). Desde la médula, algunas fibras realizan relevo en los ganglios paravertebrales, otras en cambio lo hacen en los ganglios prevertebrales, siendo uno de los más estudiados el ganglio celiaco (GC) (McNeill and Burden, 1986; Klein y Burden, 1988).

Las fibras nerviosas, que en su gran mayoría carecen de mielina, ingresan al ovario a través de dos vías: El plexo nervioso ovárico (ONP) y el nervio ovárico superior (SON) (Payer., 1978; Lawrence and Burden 1980; Hanada et al., 2011). Las fibras del primero viajan junto a la arteria ovárica e inervan la vasculatura de la glándula, mientras que las de la segunda vía, desde el GC viajan junto al ligamento suspensorio e inervan los componentes secretores del ovario, vale decir, folículos y células intersticiales (Lawrence and Burden 1980). (Figura 1).

De los folículos sólo las células de la teca son inervadas directamente por las terminaciones nerviosas del SON, no así las células de granulosa (CG) ni las de los cuerpos lúteos (Lawrence and Burden ,1980; Greiner et al. 2005).

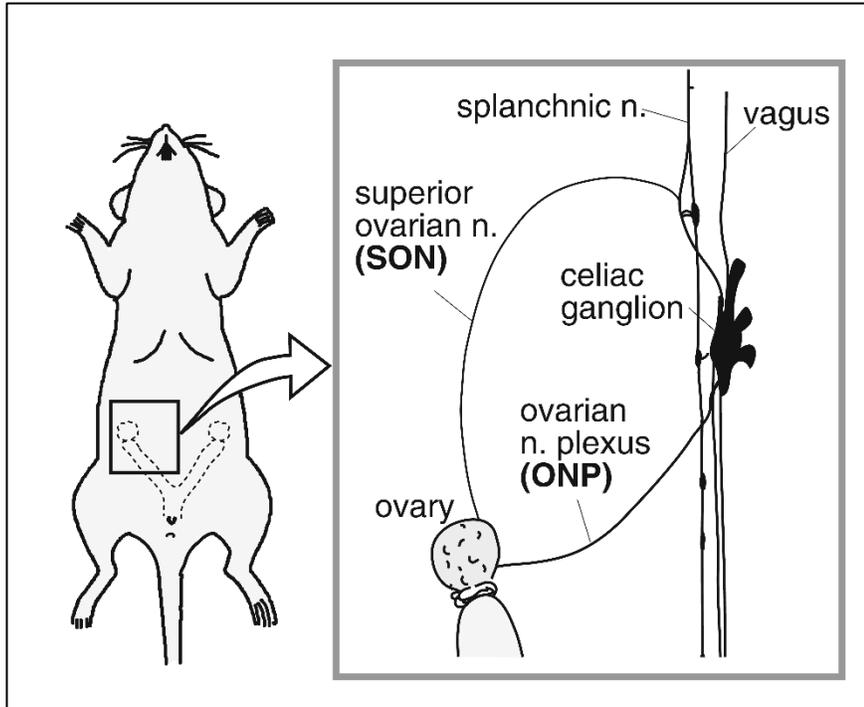


Figura 1: Plexo Nervioso Ovárico (OPN) y Nervio Ovárico Superior (SON). Ilustración de las principales vías nerviosas simpáticas que inervan el ovario de rata. (Uchida and Kagitani 2015).

Es importante mencionar que la inervación ovárica presenta cierta plasticidad. Tras el trasplante de la gónada hacia un sitio ectópico, se ha observado que el ovario es capaz de recuperar la inervación al cabo de aproximadamente 28 días, lo que se ha demostrado mediante inmunohistoquímica para marcadores de fibras simpáticas (Lara et al., 1991), y también mediante cuantificación de Noradrenalina (NA) en el ovario, tras sección quirúrgica del SON (Lara et al., 2002) (Figura 2).

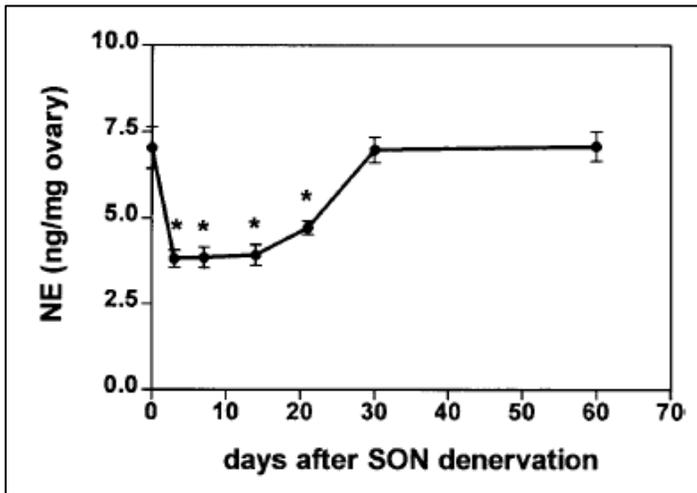


Figura 2: Variación de la concentración de NA ovárica tras sección del nervio ovárico superior: a los 3, 7, 14, 21 y 28 días posteriores a la denervación. (Fig. modificada de Lara et al., 2002)

El desarrollo de las fibras simpáticas en el ovario, no solo antecede a la regulación ejercida por el eje HPO sobre la gónada a través de las hormonas folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), sino que incluso precede al inicio de la foliculogénesis, es decir, al ensamblaje de los folículos (Mayerhofer et al., 1997). Estos hechos llevaron a investigar las posibles funciones de las fibras simpáticas en el ovario, llegándose a establecer su participación en el desarrollo folicular, la ovulación y la esteroidogénesis de la glándula, por mencionar algunas (Aguado et al., 1982; Aguado and Ojeda., 1984, Erickson et al., 1985., Lara et al., 2002, Morales-Ledesma et al., 2015).

Las fibras nerviosas participan de los procesos mencionados a través de los efectos generados por los neurotransmisores liberados desde sus terminaciones nerviosas, los cuales mediante unión a sus receptores actúan sobre distintos tipos celulares en el ovario.

1.2 Función de la Noradrenalina en el ovario

El ovario presenta mayoritariamente inervación de tipo simpática, siendo el neurotransmisor por excelencia la catecolamina noradrenalina (NA). Del contenido total de NA en el ovario, cerca del 90% se atribuye a las fibras nerviosas. (Lawrence and Burden., 1980, Greiner et al., 2005, 2008).

Una vez que las fibras simpáticas han recibido algún estímulo, los terminales presinápticos liberan la NA y ésta, se une a los receptores de tipo adrenérgico dispuestos en las células post-sinápticas, que en este caso, corresponden a células intersticiales y células de los folículos ováricos (Kliachko et al., 1981).

Uno de los receptores adrenérgicos más estudiados corresponde al subtipo β_2 , el cual ha sido descrito en células de la teca, de la granulosa (Kliachko et al., 1981) y de los cuerpos lúteos (Aguado et al., 1982). Este receptor estaría acoplado a Adenilato Ciclasa (AC) y por consiguiente a la producción de AMP cíclico (cAMP). Entre los efectos descritos por la activación de este receptor, se ha reportado la inducción de la síntesis de andrógenos y progesterona, más no, la secreción de Estradiol (Greiner et al., 2008). Los niveles de este receptor en el ovario varían durante el ciclo estral, presentando un comportamiento tipo *“up and down regulation”*, frente a su ligando, es decir, cuando la disponibilidad de NA es alta, el receptor disminuye y viceversa, lo que podría interpretarse como inducción de la internalización del receptor por parte de la catecolamina como forma de autorregular sus efectos (Fernandois et al., 2012).

Por su parte, también ha sido descrita la presencia de receptores tipo α -adrenérgicos en el ovario. Un subtipo de ellos, α_1 se encontraría localizado en las paredes de los vasos sanguíneos del ovario (Itoh and Ishizuka., 2005) y se le ha atribuido efecto vasoconstrictor tras su activación (Yamamoto et al.1984). La presencia de este receptor además ha sido descrita en células de la teca de folículos maduros, en cuerpo lúteo y en tejido intersticial en el ovario de rata (Itoh and Ishizuka., 2005). En lo que respecta a su presencia en los folículos se le ha atribuido un efecto inhibitorio sobre la secreción de Testosterona (Uchida and

Kagitani., 2014). Otro subtipo de receptor, α_2 , se encontraría presuntamente localizado en las células productoras de Estradiol, donde ejercería un efecto inhibitorio sobre este estrógeno (ver figura 3). Los receptores tipo α -adrenérgico, a diferencia de los beta, no muestran variación durante el ciclo estral.

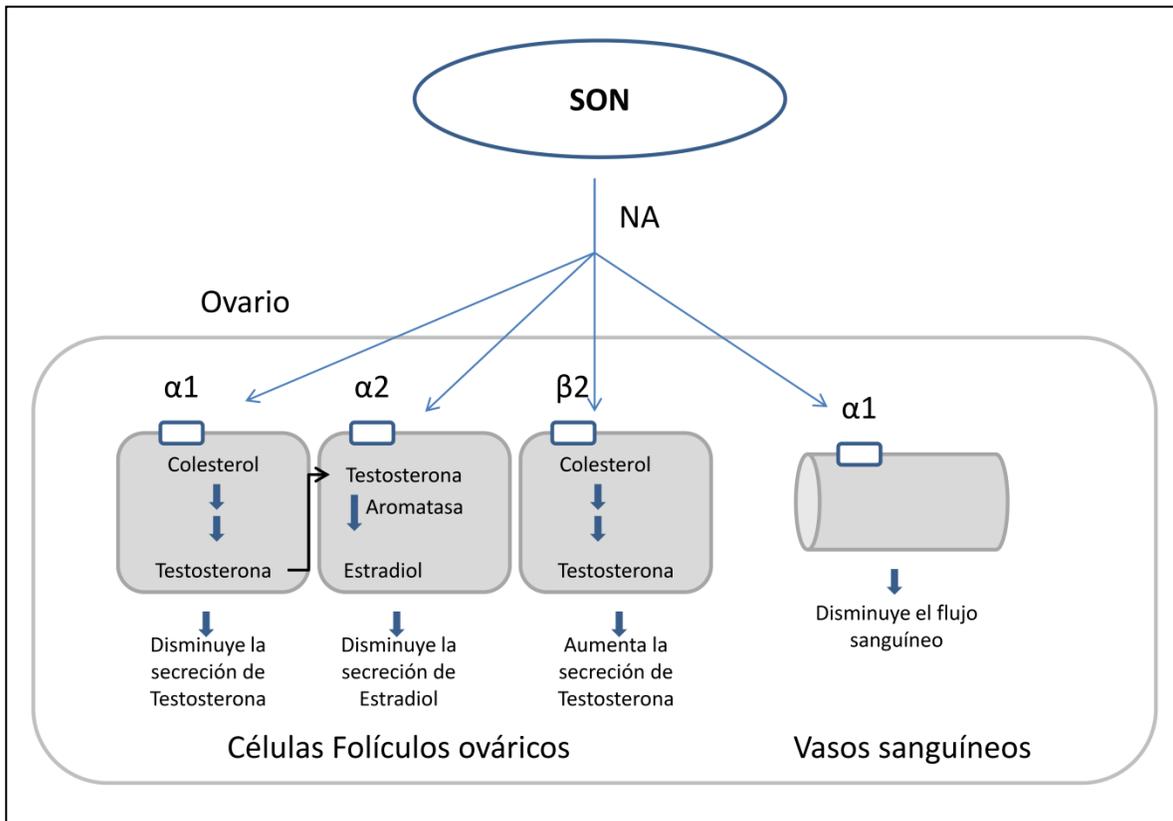


Figura 3: Efectos de la NA en el ovario: Ejemplo de algunos efectos mediados por la NA en el ovario a través de los receptores adrenérgicos. (Figura modificada de Uchida, S. 2015).

Una vez liberada la NA desde las terminaciones nerviosas, puede actuar sobre los receptores adrenérgicos o bien, puede ser almacenada en las células pos sinápticas, específicamente, en las células de granulosa. Trabajos efectuados en nuestro laboratorio han descrito toda una maquinaria desarrollada por estas células que contarían con transportadores para NA y que la almacenarían para

luego liberarla mediante un mecanismo dependiente de calcio, tal cual ha sido descrito en neuronas (Greiner et al., 2008).

Aun cuando el ovario es capaz de almacenar la NA, la principal fuente de ésta son las fibras simpáticas, y considerando que la catecolamina a través de la unión a sus receptores participa en el desarrollo folicular, la ovulación y la regulación de la síntesis y liberación de hormonas esteroidales, se hace fundamental la mantención de estas fibras en la glándula. La inervación se mantiene mediante la acción de las llamadas neurotrofinas o factores de crecimiento, que son producidos por el propio órgano blanco que en este caso es el ovario. De estos factores, si bien prácticamente todos han sido descritos en el ovario (Dissen et al., 1995), dada su relevancia en el tema a tratar, este trabajo se centra en uno de ellos: el factor de crecimiento nervioso (NGF).

1.3 Función de Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) en Ovario

Las neurotrofinas son importantes para la mantención, diferenciación y proliferación de distintos tipos celulares, no estando restringida su acción únicamente a las células neuronales (Ojeda et al., 2000; Aloe et al., 2012).

En el ovario, la expresión de las neurotrofinas tanto en roedores como en humanos, tiene lugar antes del ensamblaje de los primeros folículos primordiales (^{a,b}Lara et al., 1990; Dissen et al., 1995), lo que explicaría el por qué ocurre también antes el desarrollo de la inervación en la glándula, apoyando la idea de la función de estos factores tróficos tanto en el desarrollo como en la mantención de las fibras nerviosas (Aloe et al., 2012).

NGF es un homodímero no covalente de 12,5 kDa/monómero (Friedman and Greene., 1999), y que en el ovario es sintetizado en células de la teca (Dissen et al., 1991), y células intersticiales (^bDissen et al., 1996). Sus efectos en el ovario son ejercidos sobre los mismos folículos así como también sobre las fibras que

inervan la glándula (Dissen et al., 2000; Lara et al., 2000). Las acciones de NGF son mediadas por la unión del factor de crecimiento a dos tipos de receptores: NTR1 (TrkA) y NTR P75 (p75^{NTR}) (Chao et al., 1995).

TrkA o receptor para la Tropomiosina Kinasa A, (Huang and Reichardt., 2003), también conocido como receptor de alta afinidad para NGF, es expresado en células de la granulosa (folículos preantrales y antrales) y en células de la teca (folículos antrales) (Salas et al., 2006) así como en células intersticiales (^aDissen et al., 1996). Según lo reportado, TrkA es capaz de activar las siguientes vías de señalización: MAPK (Proteína Kinasa Activada por factor mitogénico Ras), ERK (Kinasa regulada por señal extracelular), PI3K-Akt (Kinasa Fosfatidilinositol-3), y PLC- γ (Fosfolipasa-C gamma) (Aloe et al., 2012); todas asociadas a la diferenciación, plasticidad y sobrevivencia celular (Friedman et al., 1999).

En lo que respecta al segundo receptor, p75^{NTR} (receptor para neurotrofinas p75) o receptor de baja afinidad, cabe mencionar que es capaz de unir a todas las neurotrofinas, aunque con distinta afinidad (Rodríguez-Tébar et al., 1990; Chao et al., 1995). p75^{NTR} es una glicoproteína de transmembrana perteneciente a la superfamilia del receptor TNF/Fas/CD40 (Friedman et al., 1999) y que en el ovario, se expresa en células de la teca principalmente y en menor medida en células de granulosa (Dissen et al. 1991; ^{a,b}Dissen et al.,1996); y también, se ha reportado su presencia en las terminaciones de las fibras nerviosas (Dissen et al., 1991). Este receptor induciría la activación de vías de señalización como Jun – Kinasa y NF- κ B (Aloe et al., 2012), cuyos efectos serían dependientes de la coexpresión de otros receptores como el ya mencionado TrkA (Carter et al., 1996; Chao et al., 1995; Plo et al., 2004). Con esto nos referimos por ejemplo, a que la sola expresión de p75^{NTR}, de acuerdo a lo reportado en diversos trabajos (Aloe et al., 2012, Carter et al., 1996) induciría apoptosis en las células, mientras que al ser coexpresado con TrkA, potenciaría los efectos de este último receptor (⁴⁹Chao et al., 1995). La explicación a este comportamiento también es variada, mientras algunos plantean que TrkA inhibe las vías activadas por p75^{NTR} (⁵⁴Plo et al., 2004), otros postulan que la afinidad de TrkA por NGF se vería aumentada por el receptor de baja afinidad p75^{NTR} (Chao and Hempstead., 1995, Hantzopoulos et al., 1994).

Teniendo una idea de los receptores para NGF, así como su distribución en el ovario y las vías de señalización activadas, cabe mencionar los efectos que induce tanto en los componentes secretores como en las fibras nerviosas del ovario.

NGF participaría en el desarrollo folicular (Ojeda et al., 2000), así como en el proceso de ovulación, facilitando la ruptura de la pared folicular (Mayerhofer et al., 1996, ^bDissen et al., 1996), y ejercería además un efecto esteroideogénico en el ovario (Dissen et al., 2000)

En lo que respecta al efecto trófico de NGF sobre las fibras nerviosas presentes en el ovario, en términos generales, su expresión constitutiva se atribuye a su participación en el desarrollo y mantención de las fibras nerviosas en el ovario, como se demostró, mediante la administración de anticuerpos anti-NGF en ratas neonatas, donde se observó que la carencia del factor trófico impide el desarrollo de la inervación en el ovario de manera irreversible (^{a,b,c}Lara et al., 1990; Dissen et al., 1991). Pero además, se sabe que NGF regula la síntesis de NA directamente, mediante la inducción selectiva de la enzima tiroxina hidroxilasa (TH), que es la enzima limitante en la síntesis de la catecolamina (Otten et al., 1977; Aloe et al., 2012). De acuerdo a este último punto, existe entonces una estrecha relación entre NGF (producido en el ovario) y la NA (producida por las fibras nerviosas que llegan al ovario), en la que la neurotrofina regula la síntesis de la catecolamina. Entonces, si NGF regula no sólo el desarrollo y mantención de las fibras nerviosas en el ovario, sino que además regula la síntesis de NA, ¿qué es lo que regula a su vez al factor trófico?. Esta interrogante ha sido en parte respondida en trabajos efectuados en nuestro laboratorio en donde se ha observado que el estradiol tendría participación en la regulación de la expresión de NGF (Lara et al., 2000; Manni et al., 2006; Sotomayor-Zárate et al., 2008).

1.4 Función del Estradiol (E₂) en el Ovario

El E₂ es una hormona de tipo esteroidal, derivada del colesterol que en el ovario se produce en las células de la granulosa como consecuencia de la acción de la enzima aromatasa citocromo P450 sobre la testosterona (El-Maasarany et al., 1991). Una vez sintetizada, al ser una hormona de tipo esteroidal, tiene la capacidad de atravesar la membrana plasmática de la célula, y de ahí difundir hacia los blancos en donde ejercerá su acción.

Algunas de las funciones del E₂ en el ovario son promover la foliculogénesis, aumentar la expresión de receptores para gonadotrofinas, aumentar la síntesis de hormonas esteroidales e inhibir la apoptosis en las células de granulosa (Kumar et al., 2018)

Los efectos del E₂, se generan a través de la unión a sus receptores. Dos de los receptores descritos para E₂ son: ER_α y ER_β (Receptor para Estradiol alfa y beta respectivamente), los cuales son codificados por genes distintos (Yasar et al., 2016) y vía regulación transcripcional pueden tener efectos complementarios u opuestos (Mycevych et al., 2017). En el ovario, ER_α es más abundante en células de la teca, mientras que ER_β se expresa preferentemente en células de granulosa (Yasar et al., 2016; Binder et al., 2013; Deroo et al., 2009). Estos receptores pueden ser activados a través de 2 vías: una de ellas es la clásica descrita para hormonas de tipo esteroidales, en la que el E₂, atraviesa la membrana plasmática de la célula para unirse al receptor que se encuentra localizado en el citoplasma. Luego este complejo ligando-receptor se dirige al núcleo, en donde mediante su unión a Elementos de Respuesta a Estradiol (EREs), regula la expresión de genes específicos (Heldring et al., 2007). La otra vía, descrita de manera más reciente, genera una respuesta rápida a este estrógeno por parte de la célula blanco y se produce, porque los mismos receptores ya mencionados tienen la capacidad de anclarse a la membrana plasmática de la célula y mediante acoplamiento a otros receptores activar diferentes vías de señalización (Micevych et al., 2017).

Otro receptor, asociado a estradiol corresponde a GPR30, que es un receptor de transmembrana asociado a proteína G y cuyo mRNA ha sido descrito en distintos tejidos, entre ellos en ovario. La activación de este receptor, aun cuando queda bastante por investigar se ha asociado con vías relacionadas a la proliferación celular. En macrófagos por ejemplo, se ha reportado que la activación de este receptor tiene por efecto inducir la producción de NGF (Kanda and Watanabe., 2003; Prossnitz et al., 2007). Este último efecto, ha sido también reportado por otros grupos de investigación, en donde se ha observado que E₂, en ovario induce no solamente la expresión del factor trófico, sino también la de su receptor p75^{NTR}. Específicamente en nuestro laboratorio se ha visto que la administración de una dosis única de Valerato Estradiol, utilizada para inducir la condición quística en el ovario de rata, produce en primer lugar un aumento de NGF y de P75^{NTR} en la glándula, lo que se ha asociado a la inducción de un aumento en el tono simpático del ovario que es lo que finalmente provocaría la aparición de quistes en el mismo (Lara et al., 2000; Dissen et al., 2000; Sotomayor-Zárate et al., 2008).

La secreción de E₂ es controlada por el eje HPO (Christensen et al., 2012; Berga and Naftolín., 2012), pero también por el SNA (Uchida and Kagitani., 2016). Mediante estimulación de diferentes áreas del cerebro en ratas hipofisectomizadas y adrenalectomizadas, así como también a través de la interrupción de las fibras nerviosas que llegan hasta el ovario, se han visto efectos en la secreción de Estradiol que son independientes del eje HPO, lo que ha confirmado la noción de que ambas vías endocrina y nerviosa son requeridas para el funcionamiento del ovario y trabajan de manera coordinada (Kawakami et al., 1981; ^bAguado and Ojeda 1984).

En lo que respecta a la regulación vía nerviosa, se ha visto que dependiendo de la fase del ciclo estral de la rata, la activación de SON o aumentaría o inhibiría la secreción de Estradiol. En la fase Estro del ciclo, de acuerdo a lo reportado por Kagitani y Uchida, lo que se observa es un efecto inhibitorio sobre el estrógeno. Si bien, aún se discute cual sería el mediador de este efecto, algunos proponen que

sería a través de receptores β -adrenérgicos (Fernandois et al., 2012) mientras otros postulan al receptor α_2 como responsable (Uchida S., 2015).

1.5 Envejecimiento Ovárico

Como se mencionó en la introducción, la postergación de la maternidad y la aparición de patologías que en algunos aspectos se asemejan a lo observado durante el envejecimiento ovárico, hacen necesario, estudiar la ventana de subfertilidad en el ovario, que es justamente la transición entre la fertilidad y el cese de la función reproductiva del órgano, con el objetivo de, en el mejor de los escenarios, retrasar esta etapa en la mujer o revertir la condición en el caso de las patologías.

Durante esta etapa en el ovario, comienzan a observarse una serie de cambios, que se repiten tanto en la rata como en el humano, algunos de estos cambios se describen a continuación.

Los niveles de NA ovárica aumentan en la rata a partir de los 8 meses de edad (que es justamente cuando comienza la subfertilidad), alcanzando los niveles más altos a los 12 meses (Chávez-Genaro et al., 2007; Acuña et al., 2009). Este incremento en el contenido de la catecolamina, tal como se demostró en nuestro laboratorio responde a un aumento en el tono simpático del ovario, reflejado en un incremento en la capacidad para liberar el neurotransmisor por parte de las fibras simpáticas, descartándose una acumulación de NA en el ovario (Acuña et al., 2007) (Figura 4).

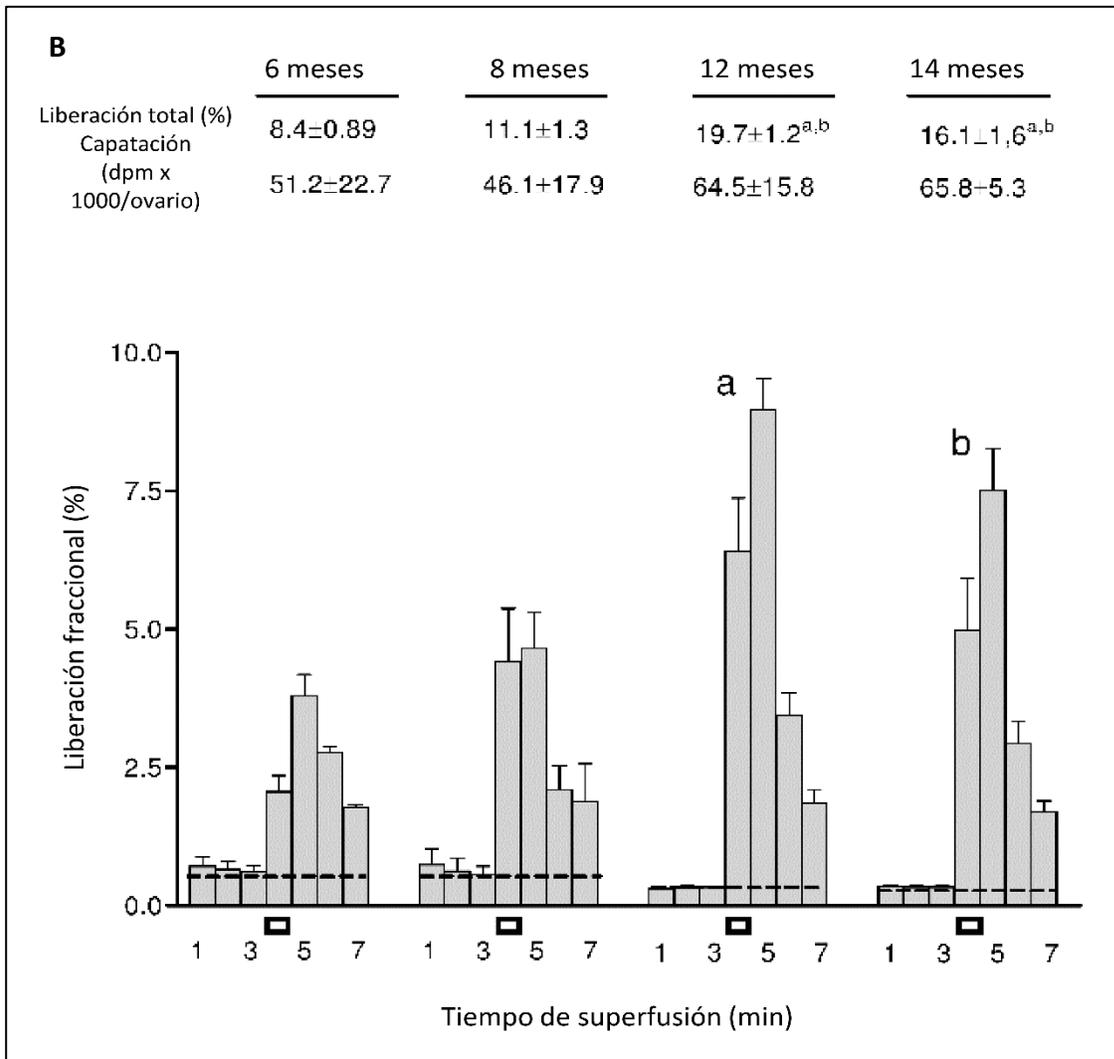
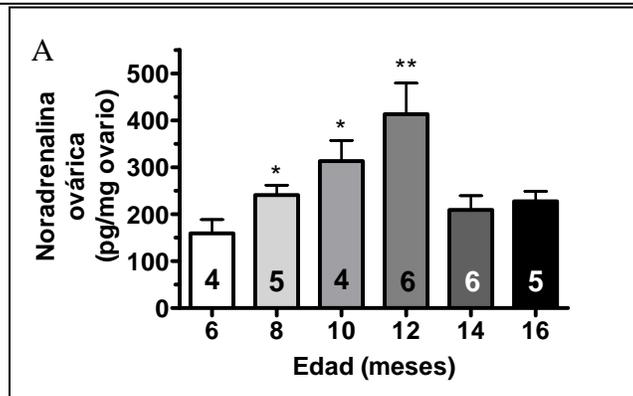


Figura 4: A: Contenido de NA en el ovario durante el envejecimiento reproductivo en rata (Figura modificada de la memoria de Acuña E., 2009). **B:** Porcentaje de liberación fraccionada de NA en el ovario durante el envejecimiento reproductivo en rata (Figura modificada de Acuña et al., 2009)



Los niveles de NGF en el ovario por su parte, disminuyen durante el periodo de subfertilidad, alcanzando su valor más bajo a los 10 meses de edad (Díaz A., 2009). Un patrón similar es el que se observa en los niveles de Estradiol plasmático, durante el envejecimiento en la rata, los cuales comienzan a disminuir a partir de los 6 meses, alcanzando los niveles más bajos a los 10 meses, para luego mantenerse sin variaciones hasta por lo menos los 14 meses de edad (Acuña et al., 2009)(Figura 5).

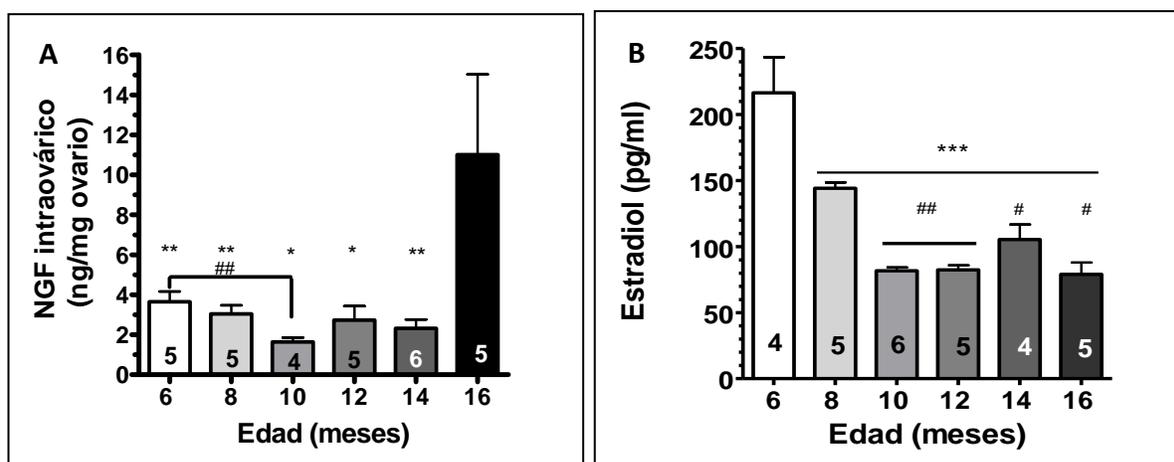


Figura 5: A: Contenido de NGF en el ovario durante el envejecimiento reproductivo en rata. **B:** Niveles Plasmáticos de Estradiol durante el envejecimiento reproductivo en rata (figuras modificadas de la memoria de Acuña E., 2009)

El aumento en el tono simpático descrito en el ovario durante el periodo de subfertilidad, con el consecuente incremento de NA, podrían explicar y apoyar lo reportado por Uchida y Kagitani 2014, sobre el efecto inhibitorio de SON sobre Estradiol, que se encuentra efectivamente disminuido durante esta etapa en el ovario. Aún más, la disminución de NGF podría ser explicada por los niveles observados de Estradiol, confirmando el efecto inductor de la hormona sobre el factor trófico, descrito por Lara et al., 2000. Sin embargo, el aumento del tono simpático y de la NA, no se explican considerando que NGF sería responsable de la mantención de las fibras nerviosas y de la inducción de la enzima tiroxina

hidroxilasa, lo que estaría dando cuenta de una desregulación del sistema Estradiol-NGF-NA en el ovario durante el periodo de subfertilidad. O bien, NGF disminuye, como mecanismo compensatorio para evitar que continúe aumentando el tono simpático y la NA en el ovario.

1.6 Simpatectomía ovárica.

La simpatectomía o denervación del ovario, ha sido descrita por diversos grupos de trabajo como metodología para evaluar los efectos de la ausencia de la inervación en la gónada y así, poder establecer sus funciones. Ahora bien, los efectos observados tras la interrupción del suministro de fibras nerviosas en el ovario en ratas neonatas, pre-púberes y en periodo fértil son diversos, por ejemplo, se habla de retraso en el inicio de la pubertad, disrupción de la ciclicidad estral, cambios en la secreción de esteroides y alteraciones de los niveles de las hormonas de la pituitaria (^{a,b}Aguado and Ojeda., 1984; Forneris et al., 2002). Sin embargo, los resultados en algunas ocasiones son discordantes y esto se explica por la multiplicidad de factores que se deben considerar al momento de efectuar la denervación. Algunos de estos factores son:

-La edad: la denervación en etapa neonata implica un sistema nervioso inmaduro y en desarrollo aún; en etapa cercana a la pubertad un sistema hiperactivado, mientras que en edad adulta y período fértil, un sistema totalmente desarrollado y funcionando de manera óptima.

-Método de denervación. Existen varios métodos, entre los más utilizados están:
1) El de anticuerpo contra el factor de crecimiento nervioso (anti-NGF), que suele utilizarse en ratas neonatas. Este anticuerpo inhibe el desarrollo de fibras nerviosas de manera irreversible, aunque no discrimina entre fibras simpáticas o sensoriales (^aLara et al., 1990).

2) La utilización de guanetidina, la que genera una reacción de tipo auto-inmune que destruye todas las fibras simpáticas de manera irreversible. Este método si

bien es específico para fibras simpáticas, es a la vez, sistémico, atacando todas las fibras del SNP (Lara et al., 1990). 3) Por último, se utiliza también la denervación de tipo física, en la que mediante intervención quirúrgica se efectúa el corte del ligamento suspensorio en el caso de interrumpir, por ejemplo el SON. Este método, si bien implica la pérdida de otro tipo de fibras nerviosas- como fibras sensoriales- que llegan al ovario, sí permite especificidad, en cuanto a que se interrumpe por ejemplo sólo SON y no OPN, y que es por tanto un efecto local, y no sistémico, además de poder efectuarse a prácticamente cualquier edad de la rata (Aguado and Ojeda., 1984; Forneris et al., 2002).

-Tipo de denervación: uni- o bilateral, es decir, si se efectúa a uno o ambos ovarios.

En varias ocasiones, sobre todo en lo que respecta a SOP y PCO, en que hay un aumento de la actividad simpática en el ovario, se ha planteado como posible solución la denervación de la glándula, ya que por un lado revertiría la formación de quistes (Barria et al., 1993) y por otro habría un restablecimiento de la ciclicidad estral, sumando a esto una eventual recuperación de la inervación, lo que podría interpretarse como un reinicio o restablecimiento del eje nervioso. Esto se ha observado en ratas jóvenes pero, no se sabe qué ocurriría en ratas en periodo subfértile al interrumpir el SON. Es por esta razón, que teniendo en consideración los antecedentes ya expuestos, se plantea la siguiente hipótesis:

Hipótesis

“El ovario recupera la inervación simpática después de la simpatectomía bilateral del nervio ovárico superior durante el periodo de subfertilidad de la rata”

Objetivo General

Determinar la recuperación de la inervación simpática del ovario de rata en periodo fértil y subfértil tras ser sometido a denervación quirúrgica bilateral del nervio ovárico superior

Objetivos específicos

1. Evaluar la recuperación de la inervación simpática mediante la determinación de los niveles de NA y NGF en el ovario a los 14 y 28 días post-simpatectomía, tanto en el período fértil como subfértil.
2. Evaluar la relación entre NGF y E₂ en el proceso de reinervación mediante la determinación de los niveles séricos del estrógeno a los 14 y 28 días post-simpatectomía del ovario en período fértil y subfértil.

2.-Materiales y métodos

2.1 Animales

Se utilizaron ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley de 5 y 9 meses de edad, obtenidas del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones controladas de luz (12 hrs de luz y 12 hrs de oscuridad), y temperatura (22-24°C), además de contar con agua y alimento *ad libitum*. Se utilizó un total de 48 animales, 24 de ellos en edad fértil (5 meses de edad) y los otros 24 en periodo de subfertilidad (9 meses de edad) según lo descrito en Acuña et al., 2009. En cada periodo, las ratas fueron subdivididas en 4 grupos, cada uno de 6 ejemplares. Los grupos fueron los siguientes: sham14, sonx14, sham28, sonx28 (esta división puede observarse en la tabla 1). Los grupos sonx, corresponden a grupos de ratas sometidos a una intervención quirúrgica, donde se seccionó el nervio ovárico superior. Los grupos sham, corresponden a grupos control en los que se efectuó exactamente el mismo procedimiento, a excepción del corte del SON, con el propósito de asegurar que los resultados obtenidos fueran atribuibles sólo a la denervación y no al estrés que conlleva el procedimiento quirúrgico.

En cuanto a la numeración que acompaña a cada grupo, ésta hace referencia al día en que se efectuó el sacrificio de la rata, considerando como día cero aquel en que se llevó a cabo la cirugía. Se escogió el día 14 post- intervención como día de sacrificio debido a que, de acuerdo a lo descrito en la literatura, transcurridas dos semanas de la denervación, es posible descartar completamente el contenido remanente de los terminales nerviosos seccionados y por tanto no influye en las determinaciones a efectuar. El día 28, por su parte se escogió porque de acuerdo a lo reportado en otros trabajos (Lara et al., 1991; Lara et al., 2002), del mismo laboratorio, es a los 28 días cuando se restablece completamente la inervación una vez que ha sido interrumpida.

	sham14	sonx14	sham28	sonx28
Fértil (05 meses de edad)	6	6	6	5
Subfértil (09 meses de edad)	6	6	5	6

Tabla 1: División de los grupos experimentales

Se controló el peso de cada animal, al momento de la cirugía y al momento del sacrificio, además de efectuar seguimiento del ciclo estral, con el fin de recabar la mayor cantidad de información que nos pudiese aportar sobre los efectos o la respuesta del animal frente a la cirugía de denervación. Las ratas fueron eutanasiadas, mediante decapitación, tras lo cual se recolectó el plasma y se extrajeron ambos ovarios. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su utilización.

Todos los procedimientos realizados fueron aprobados por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile

2.2 Determinación del Ciclo Estral.

El ciclo reproductivo de las ratas hembras, recibe el nombre de ciclo estral y tiene una duración aproximada de 4-5 días, lo que convierte a la rata en un modelo ideal para efectuar investigación acerca de reproducción. Este ciclo comprende fases denominadas: proestro (P), estro (E), metaestro (M) y diestro (D). El ciclo se produce como consecuencia de variaciones hormonales, que a su vez generan cambios en la morfología del ovario, útero y vagina (Paccola et al., 2013). De este modo, la observación de frotis vaginal al microscopio es un reflejo del funcionamiento ovárico. Las fases del ciclo se identifican de acuerdo a la proporción de tres tipos de células observadas en los frotis: células epiteliales, células cornificadas y leucocitos. En proestro, predominan las células epiteliales

nucleadas que son redondas; en estro se observa una mayor proporción de células cornificadas anucleadas que presentan bordes irregulares; en metaestro en cambio, aparecen los tres tipos celulares en la misma proporción; y en diestro existe una predominancia de leucocitos (Marcondes et al., 2002) (Figura 6).

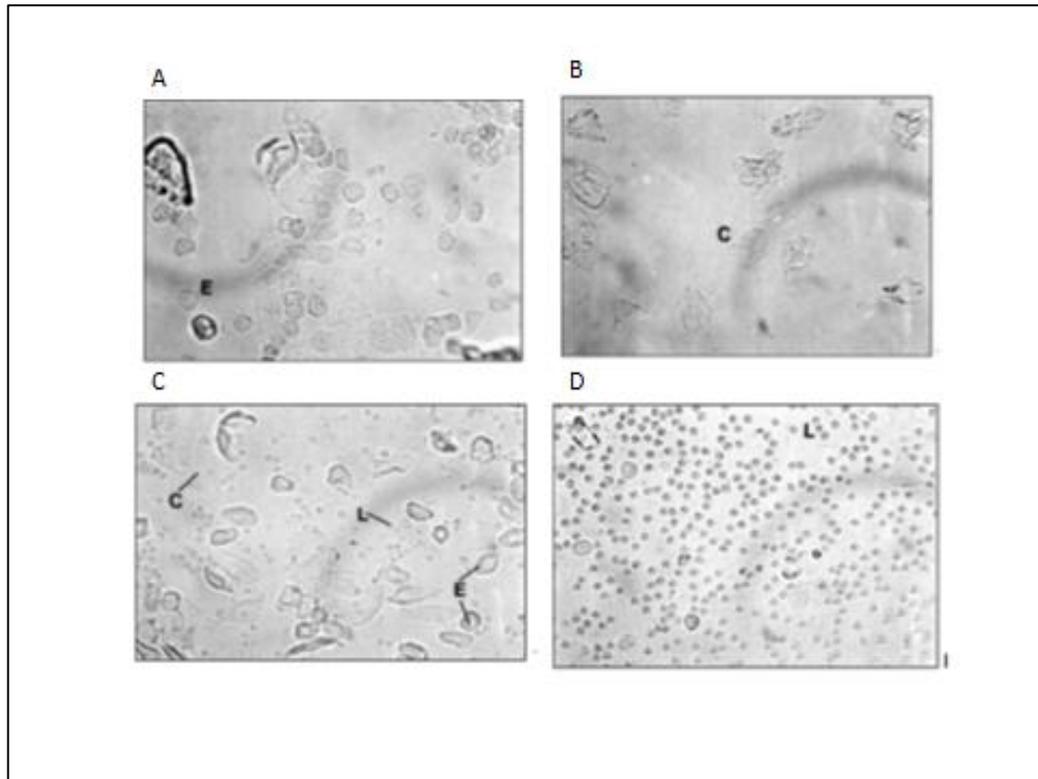


Figura 6: Citología de un frotis vaginal de rata sin tinción observado a microscopio de luz con aumento 40X. Proestro (A), estro (B), metaestro (C) y diestro (D).

De acuerdo a lo observado en los frotis, para realizar el análisis de la ciclicidad de las ratas se hicieron las siguientes consideraciones: - se consideraron ciclos de 4 días aquellos que siguieron la secuencia M/D-P-E-M/D y ciclos de 5 días como M/D-P-E-E-M/D (Esquema figura 7). Además sabiendo que la ovulación tiene lugar hacia el fin del Proestro, es que los pasos P-E-M fueron registrados como ovulación. Se consideraron como ciclos irregulares aquellos en que no siguieron la secuencia lógica P-E-M-D considerada para los ciclos de 4-5 días, o, si entre ciclos, la rata permaneció durante 3 o 5 días en la misma fase.

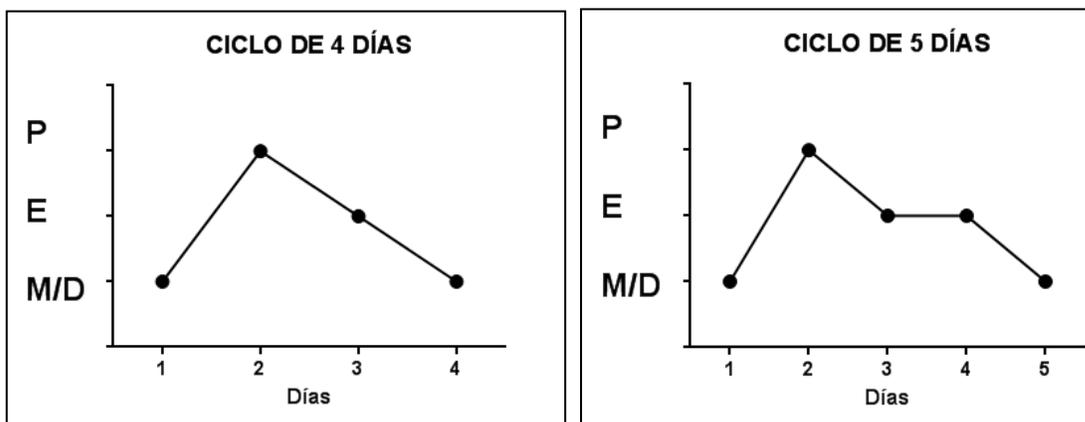


Figura 7: Esquema de un ciclo estrol de 4 y 5 días en la rata.

2.3 Sección del Nervio Ovárico Superior

Las ratas fueron anestesiadas con ketamina/zilacina (concentración según peso 60/10 mg/kg peso por vía intraperitoneal, respectivamente), tras lo cual se les realizó una incisión dorsal. A continuación se expusieron los ovarios y el ligamento suspensorio junto con el Nervio Ovárico Superior, procediendo a la sección de este último mediante corte efectuado con tijeras (Barria et al., 1993; Aguado and Ojeda 1984; Forneris et al., 2002).

2.4 Homogeneización del Tejido

Uno de los ovarios de cada rata fue homogeneizado- homogeneizador vidrio/vidrio- en 4 volúmenes de DPBS por peso de ovario, es decir, 4 μ L de DPBS por mg de ovario (La composición del DPBS es la siguiente: KCl 2.68 mM, NaCl 136.89 mM, KH_2PO_4 1.47 mM, Na_2HPO_4 8.10 mM, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0.90 mM y $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 0.49 mM). El homogeneizado resultante se dividió en dos fracciones, una para determinar NA, a la que se le adicionaron 20 μ L, de PCA 1.2 N y otra

para determinar NGF. Ambas fracciones fueron centrifugadas a 12000 g × 4 min. a 4 ° C, tras lo cual se extrajeron los respectivos sobrenadantes. El sobrenadante destinado a determinación de NGF fue diluido en razón 1:10 en DPBS. A continuación ambos sobrenadantes fueron almacenados a -80°C hasta su utilización, para preservarlos y en el caso de la NA para evitar su oxidación.

2.5 Determinación de Noradrenalina Ovárica

El contenido de NA en el ovario se cuantificó en el sobrenadante del homogenizado descrito previamente. La cuantificación se llevó a efecto mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) acoplada a detector electroquímico (Eicom ECD-700S).

Del sobrenadante se extrajo una alícuota de 50 µL, la cual fue sometida a protocolo de adsorción en alúmina (Al₂O₃) con el propósito de eliminar posibles interferentes tal como se describe a continuación:

- 1) A los 50 µL de muestra se adicionaron 20 µL de DHBA (100 pg/µL) utilizado como patrón interno, 130 µL de PCA 0.2 N, 100 µL de EDTA 0.1 M pH 7.0, 1 mL de H₂O np, 50 mg de alúmina activada y 1 mL de Tris-HCl 1.5 M-EDTA 2% pH 8.5. Se procedió a agitar y ajustar pH a 8.5-8.6.
- 2) A continuación las muestras fueron agitadas por 15 min, luego centrifugadas a 3000 rpm por 5 min, para luego sacar el líquido sobrenadante mediante aspiración. Seguido de lo anterior, las muestras se lavaron resuspendiendo en H₂O np fría, se agitaron por 10 min y nuevamente centrifugadas por 5 min (Este procedimiento de lavado-agitación y centrifugación se repitió 3 veces).
- 3) Luego de la última centrifugación se aspiró por última vez el líquido sobrenadante y luego se procedió a secar la alúmina con papel filtro.
- 4) Posteriormente las catecolaminas fueron eluidas con 50 µL de PCA 0.2 N, se agitaron, se dejaron reposar por 5 min y luego se centrifugaron por 5 min. El sobrenadante resultante fue colectado en un tubo eppendorf. Esta

elusión se repitió una vez más y los tubos fueron almacenados a -80°C hasta su utilización.

De la elusión, 20 μL fueron inyectados al sistema de HPLC Jasco PU-2089s plus acoplado a tarjeta digitalizadora Jasco LC-NetII/ADC. Para la integración de los cromatogramas se utilizó el programa computacional JASCO ChromPass Chromatography Data System v1.7.403.1.

La composición de la fase móvil utilizada fue NaH_2PO_4 100 mM, octil sulfato de sodio 0.13 mM, 0.02% EDTA- Na_2 y 0.5 % acetonitrilo. El flujo utilizado fue 1 mL/min. El potencial del detector amperométrico fue fijado en 600 mV. Bajo estas condiciones el tiempo de retención de la NA fue de 5 min y el de DHBA fue de 9 min.

2.6 Determinación del Factor de Crecimiento Nervioso (NGF)

NGF se determinó a partir del sobrenadante obtenido de la homogeneización del ovario descrita anteriormente. Se utilizó el kit NGF E_{max} ® ImmunoAssay System (Promega, Madison, Estados Unidos), procediendo a las instrucciones del mismo para efectuar la determinación.

El kit, se basa en un formato ELISA tipo sándwich, que está diseñado para la detección específica de NGF soluble. La determinación se efectuó con una dilución final de las muestras 1:8000.

2.7 Determinación de Estradiol en plasma

A partir de la sangre troncal colectada al momento de sacrificio de la rata se separó el plasma mediante centrifugación a 3000 rpm por 5 min.

La determinación se efectuó utilizando un kit de la empresa ALPCO (N°11 ESTHU E01).

El kit es un inmunoensayo enzimático de tipo competitivo. La competencia ocurre entre el estradiol de las muestras y/o estándar, y un estradiol marcado o conjugado a una enzima. Ambas formas de E_2 compiten por los sitios de unión a

un anticuerpo presente en el pocillo de la placa. El Estradiol conjugado es el responsable de la generación de color, de modo que la intensidad de color obtenida es inversamente proporcional a la concentración de la muestra. La sensibilidad del kit es de 10 pg/mL y presenta una reactividad cruzada de menor al 1.6% con otras hormonas. El protocolo, se siguió de acuerdo a lo señalado en el kit.

2.8 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como el promedio \pm error estándar. Para determinar diferencias significativas entre distintos grupos se realizó un *t-Test de Student* entre el grupo sham (utilizado como control) y el grupo sonx (denervado).

3 Resultados

3.1 Pesos de los animales y los ovarios

3.1.1 Pesos de los animales

Para evaluar si el procedimiento quirúrgico, pudo haber tenido algún efecto sobre el crecimiento de las ratas, como por ejemplo, estrés, se registró el peso de los animales, tanto al momento de la cirugía como al momento del sacrificio. Tal como puede observarse en la figura 8, no hubo una variación significativa en el peso de las ratas tras la intervención, en ninguno de los grupos experimentales estudiados. Las variaciones registradas no superan el 10% del peso del animal.

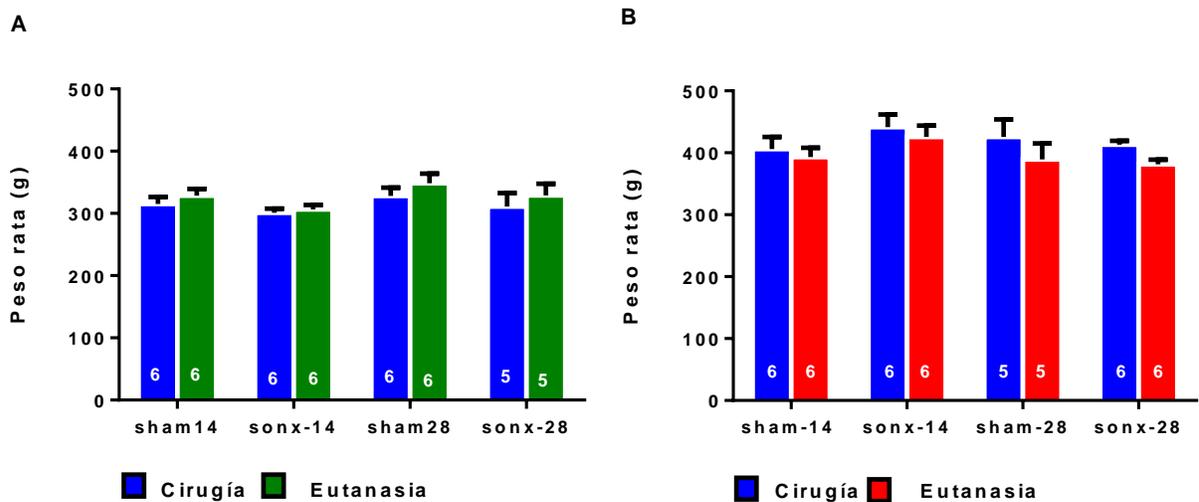


Figura 8: Comparación del peso de las ratas al momento de la cirugía y de la eutanasia. Los datos graficados corresponden al promedio \pm SEM. El número de animales está indicado en cada barra. La figura (A) corresponde a ratas de 05 meses de edad en periodo fértil. La figura (B) corresponde a ratas de 09 meses de edad en periodo de subfertilidad. Los gráficos fueron analizados por *t-test de Student* de dos colas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

3.1.2 Peso de los ovarios

Con el propósito de evaluar si la cirugía de denervación del SON había tenido algún efecto directo sobre el peso de los ovarios, y si este efecto era asimétrico, es que se registró el peso del ovario izquierdo y derecho. Al no hallar diferencias significativas, se consideró como peso del ovario, el promedio entre ovario derecho e izquierdo, y con esos valores, se evaluó la existencia de diferencias entre cada grupo denervado y su respectivo control (*sham*). Como puede observarse en la figura 9 no hubo diferencia en el peso de los ovarios entre los grupos denervados y sus respectivos grupos sham, lo que indica que la cirugía de simpatectomía no tiene efectos en el peso de la glándula.

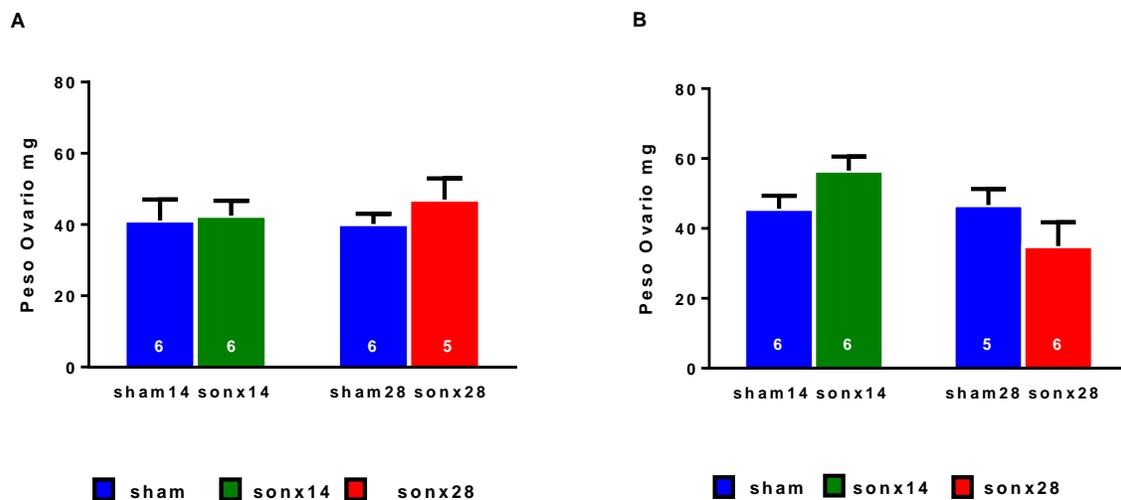


Figura 9: Comparación del peso de los ovarios de las ratas denervadas. La figura (A) corresponde a ratas de 05 meses de edad en periodo fértil mientras que la figura (B) corresponde a ratas de 09 meses edad en periodo de subfertilidad. Los datos graficados corresponden al promedio \pm SEM. El número de animales está indicado dentro de cada barra. Los gráficos fueron analizados por *t-test de Student* de dos colas.

3.2 Ciclicidad Estral

Como uno de los parámetros para evaluar el funcionamiento del ovario tras la denervación, es que se efectuó el seguimiento del ciclo estral de las ratas, mediante observación al microscopio de los frotis vaginales, realizados a diario durante las mañanas entre las 09 y las 10 hrs. El registro se efectuó entre la cirugía de simpatectomía y la eutanasia de las ratas. El detalle de los diagramas de los ciclos estales obtenidos para las ratas de cada grupo se muestra en el anexo. A partir de la información contenida en aquellos diagramas es que se efectuaron los análisis mostrados a continuación.

3.2.1 Ciclicidad de ratas en periodo fértil

Del total de días en que se registró el ciclo estral de las ratas, se calculó el porcentaje en el que habían estado las ratas en cada etapa: P (Proestro), E (Estro), M/D (Metaestro/Diestro).

No se observaron diferencias en la ciclicidad de las ratas entre los grupos sonx y sus respectivos grupos sham, ni a los 14 ni a los 28 días post-simpatectomía, lo que indica que al menos durante el periodo en que se registraron los ciclos, la simpatectomía no tuvo efectos en el ciclo estral de las ratas en edad fértil.

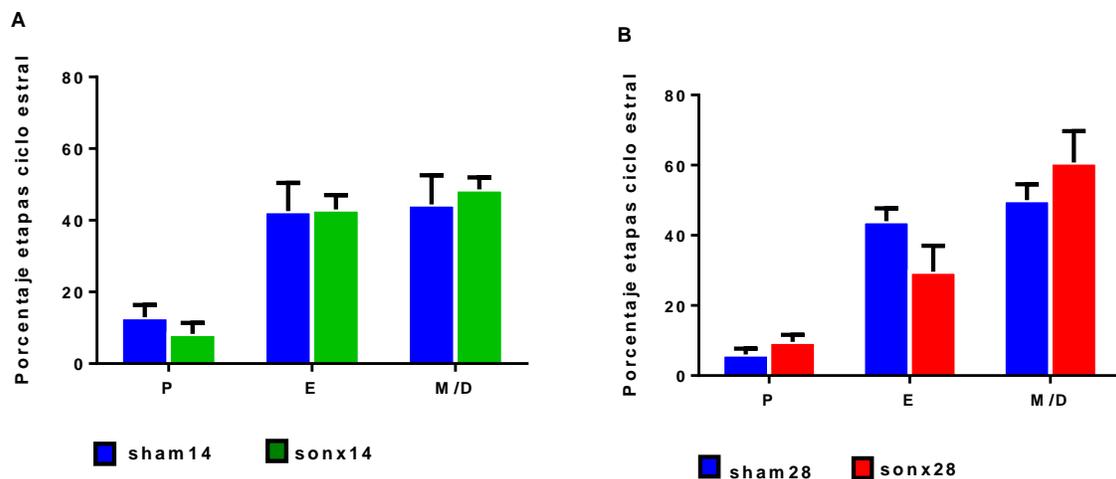


Figura 10: Porcentaje de la permanencia en las distintas etapas del ciclo estral durante el periodo comprendido entre la cirugía y la eutanasia en ratas en periodo fértil. La figura (A) corresponde al grupo sham y sonx de 14 días post- cirugía mientras que la figura (B) corresponde al grupo sham y sonx de 28 días post-cirugía. Los datos graficados corresponden al promedio \pm SEM. El número de animales está indicado en cada barra. Los gráficos fueron analizados por *t-test* de Student de dos colas.

3.2.2 Ciclicidad de ratas en periodo subfétil

Del mismo modo que se observó en el grupo de ratas en edad fértil, en el grupo de ratas de 9 meses, la simpatectomía no provocó diferencias en la ciclicidad de las ratas, transcurridos 14 y/o 28 días luego de la cirugía.

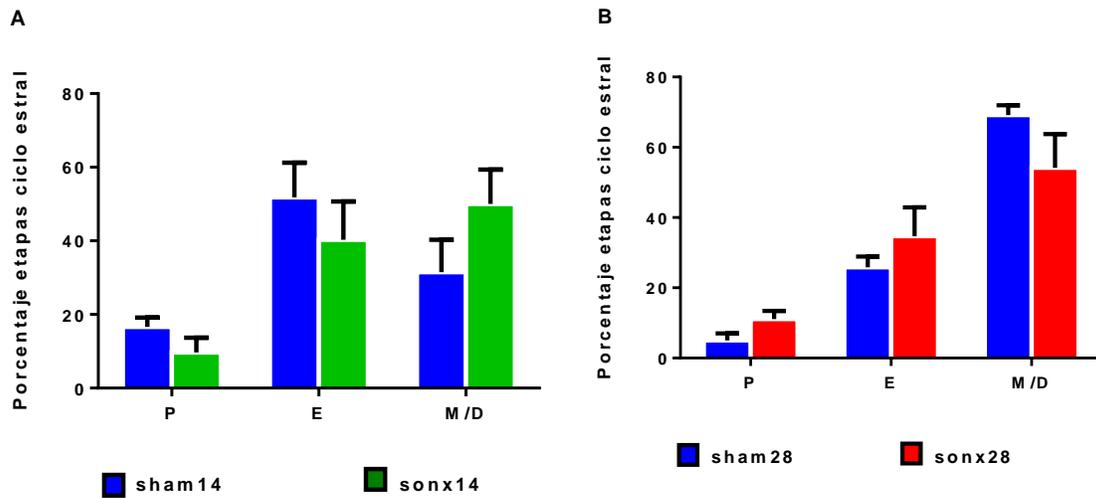


Figura 11: Porcentaje de la permanencia en las distintas etapas del ciclo estral durante el periodo comprendido entre la cirugía y la eutanasia en ratas en periodo de subfertilidad. La figura A corresponde al grupo sham y sonx de 14 días post- cirugía mientras que la figura B corresponde al grupo sham y sonx de 28 días post-cirugía. Los datos graficados corresponden al promedio \pm SEM. El número de animales está indicado en cada barra. Los gráficos fueron analizados por *t-test de Student* de dos colas.

3.3 Determinación de Noradrenalina en el ovario tras sección del SON

3.3.1 variación del contenido de Noradrenalina en el ovario tras sección del SON en ratas en periodo fértil

En ratas en edad fértil, a los 5 meses de edad, el contenido de NA en el ovario, tras la sección del SON, disminuyó significativamente a los 14 días en un 60 % (*sham* 100.00 ± 16.39 vs *sonx14* 39.74 ± 7.57); mientras que a los 28 días tras la denervación se observó una recuperación del 94% (*sham* 112.8 ± 54.57 vs *sonx28* 94.42 ± 31.35) con respecto al grupo *sham*.

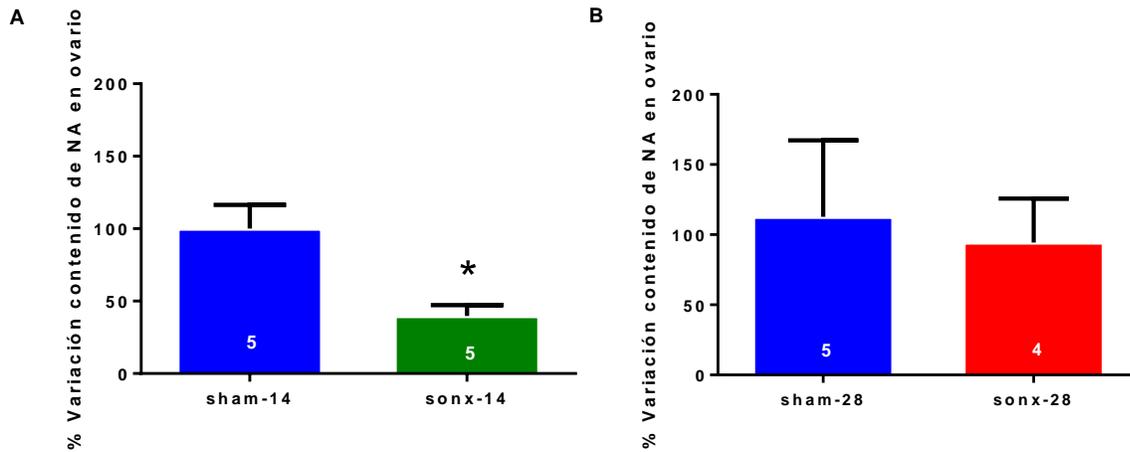


Figura 12: Recuperación del contenido de NA ovárica a los 14 y 28 días después de la sección del Nervio Ovárico Superior en ratas en periodo fértil. La figura **A** corresponde al grupo sham y sonx de 14 días post- cirugía mientras que la figura **B** corresponde al grupo sham y sonx de 28 días post-cirugía. Los datos graficados corresponden al promedio ± SEM. El número de animales está indicado en cada barra. Los gráficos fueron analizados por *t-test de Student* de dos colas. * = $p < 0.05$ versus el respectivo control sham para cada grupo estudiado.

3.3.2 Variación del contenido de Noradrenalina en el ovario tras sección del SON en ratas en periodo subfértil

En ratas en edad subfértil, a los 9 meses de edad, el contenido de NA en el ovario, tras la sección del SON, disminuyó significativamente a los 14 días en un 52% (*Sham* 100.00 ± 3.88 vs *Sonx14* 48.32 ± 17.04); mientras que a los 28 días tras la denervación se observó una recuperación en torno al 60 % (*sham* 99.99 ± 32.06 vs *sonx28* 59.58 ± 15.73) con respecto a *sham* y de un 11% con respecto al grupo *sonx14*.

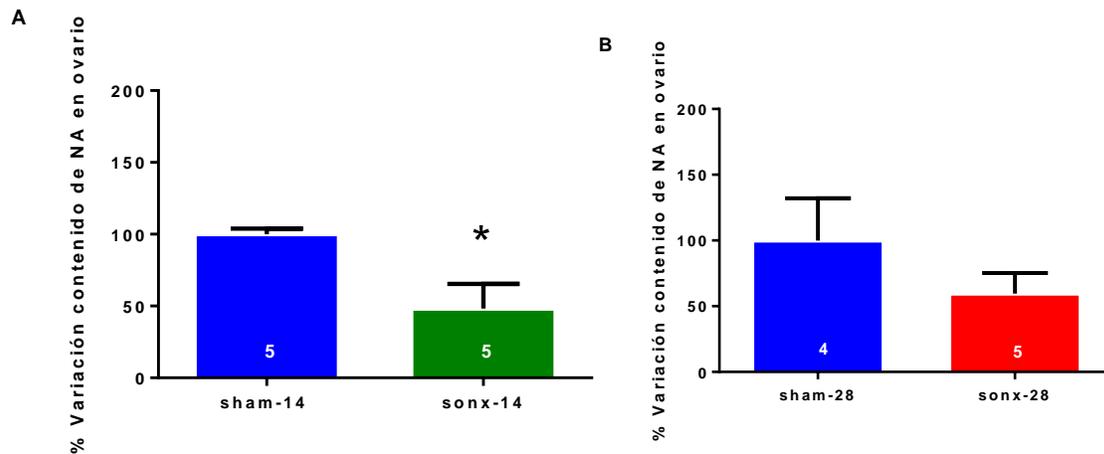


Figura 13: Recuperación del contenido de NA ovárica a los 14 y 28 días después de la sección del nervio ovárico superior en ratas en periodo subfértil. La figura **A** corresponde al grupo sham y sonx de 14 días post- cirugía mientras que la figura **B** corresponde al grupo sham y sonx de 28 días post-cirugía. Los datos graficados corresponden al promedio \pm SEM. El número de animales está indicado en cada barra. Los gráficos fueron analizados por *t-test de Student* de dos colas. * = $p < 0.05$ versus el respectivo control sham para cada grupo estudiado.

3.4 Determinación de NGF en el ovario tras sección del SON

3.4.1 Determinación del contenido de NGF en el ovario tras sección del SON en ratas en periodo fértil

En las ratas de 05 meses de edad, se observó una tendencia al aumento de NGF, transcurridos 14 días luego de la denervación del SON (*sham* 1.11 ± 0.15 vs *sonx14* 1.93 ± 0.43), mientras que a los 28 días el factor trófico tiende a retornar a sus niveles basales (*sham* 1.34 ± 0.18 vs *sonx28* 0.98 ± 0.30).

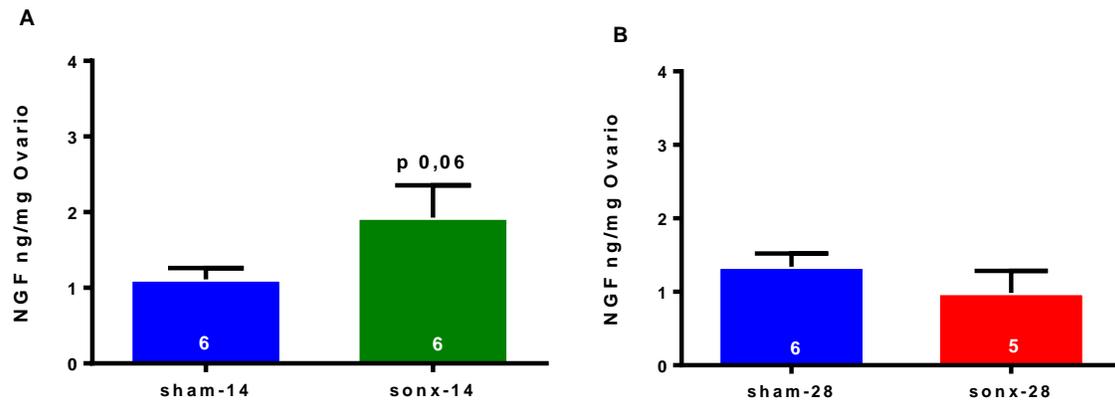


Figura 14: Contenido de NGF ovárico a los 14 y 28 días después de la sección del nervio ovárico superior en ratas en periodo fértil. La figura **A** corresponde al grupo sham y sonx de 14 días post- cirugía mientras que la figura **B** corresponde al grupo sham y sonx de 28 días post- cirugía. Los datos graficados corresponden al promedio \pm SEM. El número de animales está indicado en cada barra. Los gráficos fueron analizados por *t-test de Student* de una cola.

3.4.2 Determinación de NGF en el ovario tras sección del SON en ratas en periodo subfétil

A los 09 meses de edad, los niveles de NGF, transcurridos 14 días de la denervación, permanecieron sin cambios (*sham* 1.59 ± 0.20 vs *sonx14* 1.74 ± 0.19), sin embargo, al cabo de 28 días, los niveles del factor trófico aumentaron significativamente (*sham* $1,02 \pm 0,03$ vs *sonx28* 2.12 ± 0.36).

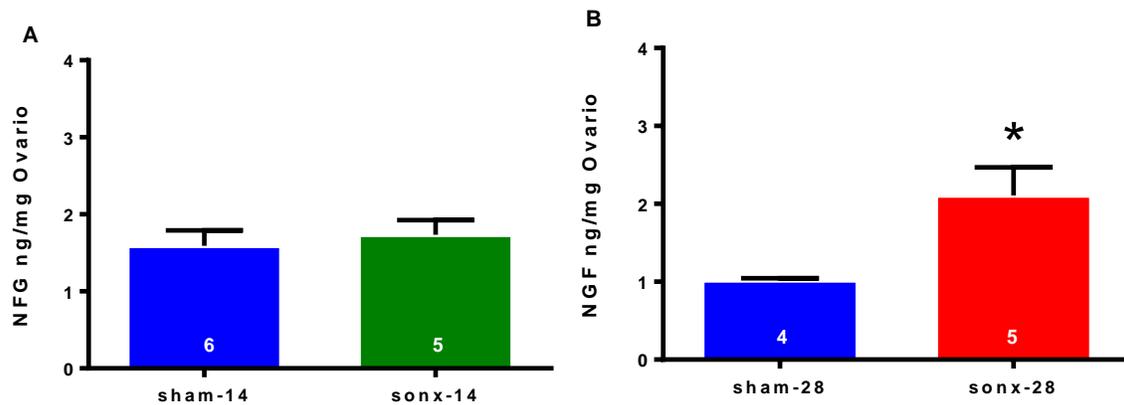


Figura 15: Contenido de NGF ovárico a los 14 y 28 días después de la sección del nervio ovárico superior en ratas en periodo subfétil. La figura **A** corresponde al grupo sham y sonx de 14 días post- cirugía mientras que la figura **B** corresponde al grupo sham y sonx de 28 días post- cirugía. Los datos graficados corresponden al promedio \pm SEM. El número de animales está indicado en cada barra. Los gráficos fueron analizados por *t-test de Student* de una cola. * = $p < 0.05$ versus el respectivo control sham para cada grupo estudiado

3.5 Determinación de Estradiol en suero tras sección del SON

Considerando de acuerdo a lo expuesto en los antecedentes un eventual efecto inhibitorio de la NA sobre el E₂, así como el posible efecto inductor de este último sobre NGF, es que se determinaron los niveles séricos del estrógeno a los 14 y 28 días post-simpatectomía.

3.5.1 Determinación de Estradiol en suero tras sección del SON en ratas en periodo fértil

Como se observa en los gráficos los niveles de Estradiol no variaron ni a los 14 días (sham 181.8 ± 9.30 vs sonx14 164.2 ± 15.16) ni a los 28 días (sham 199.7 ± 15.40 vs sonx28 182.6 ± 17.20) post- denervación en las ratas de 5 meses de edad.

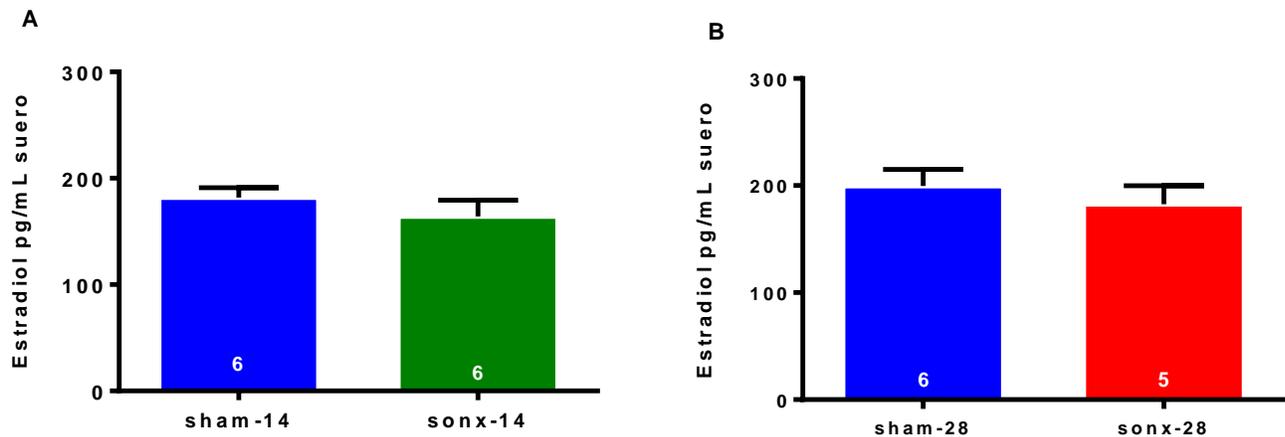


Figura 16: Contenido de Estradiol plasmático a los 14 y 28 días después de la sección del nervio ovárico superior en ratas en periodo fértil. La figura A corresponde al grupo sham y sonx 14 días post- cirugía mientras que la figura B corresponde al grupo sham y sonx 28 días post- cirugía. Los datos graficados corresponden al promedio \pm SEM. El número de animales está indicado en cada barra. Los gráficos fueron analizados por *t-test de Student* de dos colas.

3.5.2 Determinación de Estradiol en plasma tras sección del SON en ratas en periodo subfétil

Tal como se observó en las ratas de 5 meses de edad, los niveles séricos de E₂ no mostraron variaciones tras la sección del SON, ni a los 14 días (sham 213.3 ± 19.58 vs sonx14 217.6 ± 10.36) ni a los 28 días (sham 203.6 ± 18.72 vs sonx28 231.7 ± 16.89), post-cirugía de denervación del SON en ratas de 09 meses de edad.

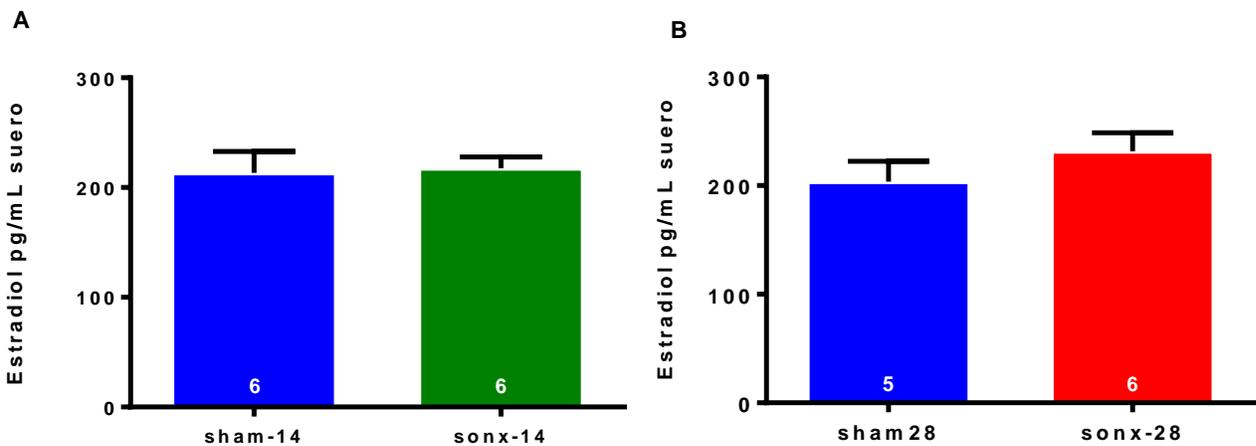


Figura 17: Contenido de Estradiol plasmático a los 14 y 28 días después de la sección del nervio ovárico superior en ratas en periodo subfétil. La figura **A** corresponde al grupo sham y sonx 14 días post- cirugía mientras que la figura **B** corresponde al grupo sham y sonx 28 días post- cirugía. Los datos graficados corresponden al promedio ± SEM. El número de animales está indicado en cada barra. Los gráficos fueron analizados por *t-test de Student* de dos colas

4. Discusión

En este trabajo se presenta evidencia que, durante el periodo de subfertilidad en la rata, el ovario disminuye la capacidad de responder a la denervación, comparado con las ratas fértiles, lo que se traduciría en una recuperación más lenta y/o parcial del contenido de noradrenalina, lo que podría estar asociado a una reinervación ovárica que requiere un tiempo superior a los 28 días reportados en ratas jóvenes.

En las ratas fértiles se observó que la denervación disminuyó alrededor de un 60% el contenido de NA ovárico a los 14 días postdenervación, Esto indica en primer lugar que la cirugía fue exitosa en términos de la interrupción o corte del SON. Esta importante disminución se explica porque de acuerdo a lo descrito en la literatura, del contenido total de NA en el ovario, aproximadamente un 90% se atribuye a las fibras simpáticas que inervan la gónada, de modo que del 40% de NA remanente observado en el ovario, un porcentaje puede ser atribuido a las fibras, también de tipo simpático, correspondientes al Plexo Nervioso Ovárico, que no fueron intervenidas en esta oportunidad; y otra porción atribuirse a la NA almacenada en las células de la granulosa, considerando que en esta etapa o edad de la rata, el número de folículos es importante y por tanto, también la cantidad de células de granulosa que hoy se sabe, son capaces de incorporar, almacenar y liberar la catecolamina de manera controlada, por un mecanismo dependiente de Calcio, bastante similar al observado en neuronas (Greiner et al., 2008).

Además, cabe mencionar que si bien en otras cepas de rata ha sido descrita la presencia de células tipo neuronales capaces de sintetizar NA, en la cepa utilizada en este trabajo, que corresponde a ratas Sprague-Dawley su presencia no ha podido determinarse al menos hasta el momento, sugiriendo que estas células neuronales pueden contribuir poco al contenido de NA restante en el ovario tras la denervación.

Continuando con lo registrado en las ratas fértiles, a los 28 días post-cirugía, se observó una recuperación del contenido de NA cercana al 90% con respecto al

grupo sham. Este resultado, confirmaría lo reportado en trabajos anteriores de nuestro laboratorio para evaluar la capacidad del ovario para recuperar la inervación: En uno de ellos, a ratas de 23 días de edad, se les efectuó un autotrasplante del ovario hacia la región del cuello cerca de la vena yugular y mediante inmunohistoquímica, usando marcadores para fibras sensoriales y simpáticas, se observó que al cabo de 28 días, el ovario recuperaba la inervación interrumpida (Lara et al., 1991). En otro trabajo, en el cual se efectuó una cirugía de denervación bilateral del SON, esta vez en ratas de dos meses de edad, se monitoreó a intervalos de 7 días el contenido de NA, observándose un restablecimiento de los niveles de la catecolamina al cabo de 28 días (Lara et al., 2002). Estos dos trabajos, permiten por un lado correlacionar los niveles de NA ovárica con el proceso de reineriación o restablecimiento de las fibras nerviosas y por otro lado confirmar que el proceso tarda entre 28 a 30 días. Lo que también se replica en un trabajo efectuado en el laboratorio del Dr. Aguado, en donde la denervación se efectuó pero en ratas neonatas de 4 días, observándose que no había diferencias en el contenido de NA entre el grupo control y las ratas denervadas, transcurridos dos meses de la cirugía (Forneris et al., 2002).

En este caso, en que la denervación se efectuó en ratas en su período óptimo de fertilidad (5-6 meses de edad), los resultados, nos permiten sugerir que, en base a los niveles de NA registrados a los 14 y 28 días pos-denervación, y que se pueden correlacionar con la presencia de fibras nerviosas de tipo simpáticas, a esta edad, el ovario mantendría intacta la capacidad recuperar la inervación, tal como se ha observado en edades más tempranas.

Otro escenario, es el que se aprecia en las ratas de 9 meses de edad (período subfértil). En estas ratas, tal cual como ocurrió en las ratas jóvenes, al cabo de 14 días, los niveles de NA, habían disminuido en torno al 40%, lo que en este caso, también indica una cirugía y procedimiento exitoso en términos de interrupción de SON. Sin embargo, en las determinaciones de NA a los 28 días pos-cirugía, se observó sólo una recuperación en torno al 60% en comparación a los niveles

obtenidos en los ovarios de ratas *sham* o bien un 11% con respecto a los niveles observados en el grupo sonx14. Estos resultados, en forma preliminar indicarían, que al no haber al cabo de 28 días una recuperación de los niveles de NA, pudiese ser que la reinervación a esta edad en la rata, o tomara más del tiempo establecido (28 días) o simplemente no se llevase a efecto. Una manera de corroborar los resultados obtenidos y responder las inquietudes planteadas, podría ser la determinación mediante inmunohistoquímica, de la presencia de fibras simpáticas en el ovario, tanto a los 14 como a los 28 días pos-denervación. Adicionalmente a esto, podría evaluarse la repetición del grupo sonx28 de 9 meses, pero esta vez, determinando los niveles de NA, por ejemplo transcurridos 60 días postdenervación, considerando que durante este tiempo una cohorte completa de folículos es renovada, lo que también podría dar indicios de la presencia o ausencia de fibras nerviosas simpáticas, ya que éstas influyen en el desarrollo folicular (McGee and Hsueh A., 2000).

Si bien de acuerdo a lo expuesto anteriormente, los niveles de NA en el ovario son un indicador del estado de inervación de la glándula, así como también los marcadores de fibras nerviosas y por tanto, permiten inferir si hay o no reinervación, queda aún por resolver otro aspecto: el origen de estas fibras nerviosas, es decir, si finalmente es SON quien se restablece o las nuevas fibras simpáticas tienen otra procedencia como por ejemplo ONP, que intentaría suplir la función de la vía original. En este caso, más allá de la recuperación de las fibras nerviosas y el contenido de NA, debiese evaluarse qué aspectos, a largo plazo, de la regulación ejercida por el SNC a través del SON se perderían de manera definitiva si es que finalmente esta vía no es restablecida.

Sabiendo que NGF es fundamental tanto para que se desarrollen las fibras nerviosas como para que se mantengan, lo que se demostró administrando anticuerpos anti NGF en ovarios de ratas neonatas dando como resultado la inhibición de la inervación en el órgano (^bLara et al., 1990), y que además es inductor de la enzima TH en las fibras simpáticas, es que se midieron los niveles de esta neurotrofina en el ovario, también a los 14 y 28 días postdenervación.

En las ratas fértiles, se observó que a los 14 días postsimpatectomía existe una tendencia al aumento de NGF, y que los niveles a los 28 días retornan a los basales. La interpretación de este resultado hace suponer que, ante la ausencia de fibras nerviosas simpáticas, en el ovario se activarían distintos mecanismos para revertir esta situación y recuperar la inervación de la glándula. Uno de estos mecanismos podría ser mediado por NGF, ya que si se efectúa una relación entre los resultados de NA y el factor trófico, podemos ver que al disminuir los niveles de la catecolamina, aumentan los de la neurotrofina y que, al recuperarse los niveles de NA también lo hacen los de NGF. Por qué vemos una tendencia y no una diferencia significativa en el contenido de NGF, podría explicarse por la dispersión de los datos, lo que podría corregirse aumentando el n del experimento; o bien porque quizás el incremento más robusto del factor trófico ocurre, previo al momento de la determinación (14 días) y lo que se está observando, es justamente el momento en que comienza a retornar a los niveles constitutivos la proteína.

En cambio, durante el periodo de subfertilidad, los niveles de NGF no mostraron variación a los 14 días, pero sí a los 28 días postdenervación, donde aumentaron prácticamente al doble de la condición basal. Esto hace suponer, que si bien los niveles de NA, disminuyen significativamente a los 14 días postdenervación, el ovario no es capaz de responder tan prontamente a esta edad, como si lo hace en las ratas en periodo fértil, activando más tardíamente los mecanismos necesarios para recuperar la inervación. Esta demora, plantea una nueva interrogante que es, si este retraso en la respuesta, presenta alguna consecuencia como por ejemplo, una recuperación parcial y no total de la inervación en el ovario.

Sí, es importante destacar, que los niveles observados en el periodo subfétil, a los 28 días, resultan bastante interesantes teniendo en consideración que la población folicular es menor que en el periodo fértil. A esto se añade que de los folículos, son las células de la Teca, las encargadas de la producción de NGF, y que de acuerdo a lo reportado por otros grupos de estudio (Doganay et al., 2010) a través de análisis morfológicos, ocurre un adelgazamiento de esta capa de

células de los folículos ováricos a causa de la denervación. De esta manera, los elevados niveles de NGF podrían explicarse simplemente por una sobreexpresión de la neurotrofina en las células de la Teca remanentes-si es que se ha producido el adelgazamiento de esta capa en los folículos- o bien podría ser que otros tipos celulares también expresen el factor trófico.

Teniendo como antecedentes primero, el efecto inductor de E₂ sobre la expresión de NGF y su receptor p75^{NTR} (Lara et al., 2000; Sotomayor-Zárte et al., 2008) y el efecto inhibitor ejercido por las fibras del SON sobre la secreción del estrógeno (Uchida,S., 2015; Uchida and Kagitani., 2016; Forneris et al., 2002), es que se pensó que la denervación aumentaría los niveles de la hormona, dando paso a los efectos observados en el NGF y la NA.

Sin embargo, ni en ratas de 6 meses de edad (periodo fértil), ni a los 9 meses (periodo de subfertilidad) se observaron variaciones en los niveles plasmáticos de E₂, entre los grupos control y los grupos denervados (de 14 y 28 días). La revisión de los resultados obtenidos por otros grupos de trabajo en cuanto a la determinación de los niveles de E₂ pos-denervación del ovario son dispares. Mientras algunos (Forneris et al., 2002) reportan aumento sostenido en el tiempo del estrógeno, otros observan un aumento cuando la denervación es unilateral, pero no registran cambios cuando es bilateral (Morales et al., 1998; Morales-Ledesma et al., 2015). Este último resultado, se asemeja a lo observado en el presente trabajo y frente ello se plantean dos posibilidades: una es que E₂, definitivamente no participe al menos de manera directa en la inducción de NGF o bien, otra posibilidad es que su participación no se vea reflejada en los niveles plasmáticos del estrógeno, sino que en el mismo ovario que es finalmente donde esperamos ver sus efectos, a través de un cambio en la expresión de receptores para Estradiol, principalmente en células de la granulosa y de la teca de los folículos ováricos.

Otro aspecto a discutir es qué podría explicar que el ovario en periodo subfértil estaría respondiendo de manera tardía a la denervación a diferencia del ovario en periodo fértil que al parecer, lo haría dentro del tiempo reportado en la literatura.

La primera gran diferencia a la que podemos atribuir este fenómeno es a la población folicular, que como ya se ha descrito en comparación al periodo fértil, en el periodo subfértil se encuentra disminuida (Acuña et al., 2009). Esto implicaría un menor número de células respondiendo al estímulo (denervación), sin embargo, dados los niveles de NGF observados, el factor población folicular, pareciera no ser el limitante en este caso.

El aumento en los niveles de NA conforme el ovario va envejeciendo, se deben a un incremento del tono simpático en la gónada: aumenta la densidad de las fibras, así como también la liberación del neurotransmisor desde sus terminales. A esto debe adicionarse la ya mencionada capacidad de las células de granulosa para captar, almacenar y liberar la catecolamina (Greiner et al., 2008). Teniendo en consideración esto, pudiese ser que, este mecanismo desarrollado por la granulosa, supliera al menos en el periodo subfértil y por cierto tiempo, la ausencia de fibras simpáticas producto de la denervación. Esto podría explicar por qué el retraso en la respuesta del ovario a la simpatectomía, observada con el aumento de NGF recién a los 28 días pos-cirugía.

Otra posibilidad adicional, surge de los neurotransmisores producidos por el ovario. Además de NGF, el ovario produce, entre otros factores de crecimiento, Factor neuronal derivado de cerebro (BDNF), que según se ha visto en neuronas simpáticas mediante unión al receptor $p75^{NTR}$, es capaz de contrarrestar el crecimiento neuronal inducido por NGF vía activación del receptor $trkA$ (Kohn et al., 1999). Se sabe, que durante el envejecimiento los niveles del mensajero (mRNA) de $p75^{NTR}$ se hallan disminuidos (Paredes., et al 2007), por lo que un aumento basal o inducido durante el periodo subfértil de los niveles de BDNF de manera transiente, pudiesen hacer que compita con NGF para unirse al receptor de baja afinidad. Esta competencia podría anular o contrarrestar los efectos mediados por NGF, dificultando así el proceso de reinervación.

Además el sólo hecho de una disminución en la expresión de $p75^{NTR}$, durante el período subfértil, podría afectar el proceso de reinervación, si se considera la idea de que este receptor es necesario no sólo para aumentar la afinidad de $trkA$ por el

factor trófico, sino también para mediar una respuesta funcional (Hantzopoulos et al., 1994; Chao and Hempstead., 1995).

En resumen, los resultados indicarían que durante el periodo de subfertilidad el ovario, tal como ha sido observado a edades más tempranas, sería capaz de recuperar la inervación simpática una vez que ésta ha sido interrumpida, y que el proceso de reinervación, efectivamente tomaría alrededor de un mes en completarse. Por otro lado, durante el periodo de subfertilidad, los resultados indicarían, que si bien, el ovario responde a la denervación, lo hace de manera tardía. Esta demora podría significar también mayor tiempo en un eventual proceso de reinervación, dejando sin embargo la interrogante de si esta recuperación sería total o parcial, y si de llevarse a efecto habría una recuperación integral de la funcionalidad ovárica. Además deja planteada la interrogante sobre el origen de las nuevas fibras nerviosas, durante la reinervación.

5. Conclusiones

5.1 Conclusiones específicas

- Ni en edad fértil ni subfértil en la rata, la cirugía de denervación bilateral de SON tuvo efectos en el peso del animal, el peso del ovario, la ciclicidad estral, y los niveles séricos de la hormona Estradiol.
- La cirugía de denervación del SON, mediante sección del ligamento suspensorio es efectiva, reduciendo significativamente los niveles ováricos de NA a los 14 días post-simpatectomía en período fértil y subfértil
- Transcurridos 28 días post-denervación en ambos períodos estudiados (fértil y subfértil) el ovario recupera contenido de NA, aunque en el periodo subfértil la recuperación es menor.
- Los resultados observados en los niveles de NGF ovárico sugieren que el factor trófico participa en el proceso de reinervación del ovario.
- Los resultados de NA y NGF, sugieren una respuesta diferencial del ovario a la denervación, según ésta se efectúe en periodo fértil o subfértil.

5.2 Conclusión general

Los resultados obtenidos tras la denervación bilateral del SON, sustentan la hipótesis, ya que durante el periodo fértil el ovario es capaz de recuperar la inervación simpática y que este proceso tardaría aproximadamente 28 días, tal como ha sido descrito en ratas más jóvenes.

Sin embargo, durante el periodo de subfertilidad, el ovario demoraría más en responder a la denervación y por lo tanto, iniciaría también más tardíamente el proceso de reinervación; permaneciendo entonces la interrogante de si a esta edad, la eventual recuperación de la inervación simpática sería parcial o total.

6. Proyecciones

Los resultados de esta memoria indicarían cierta pérdida por parte del ovario en su capacidad para responder y recuperar la inervación simpática una vez que el SON ha sido interrumpido durante el periodo de subfertilidad.

Los resultados e interpretaciones de los mismos podrían ser apoyados, mediante inmunohistoquímica, utilizando anticuerpos para marcadores de fibras nerviosas simpáticas, que permitan visualizar el proceso de reinervación del ovario.

Adicionalmente como ya se planteó en la discusión sería útil repetir la denervación en ratas en período subfértil (9 meses de edad), pero esta vez aumentando el tiempo de análisis tanto de NA como de NGF, por lo menos a 60 días.

Sería también interesante analizar que sucede con el ciclo estral de las ratas en las diferentes condiciones que pudiesen observarse transcurrido un tiempo prudente, más allá de los 28 días en las ratas fértiles y en la medida de lo posible más de los 60 días en el caso de las ratas en periodo subfértil. Esto debido a que sería interesante analizar cómo se comporta la ciclicidad si se recupera total o parcialmente la inervación o si no ocurre.

Entender y dilucidar los mecanismos involucrados en el proceso de reinervación es importante, por lo que podría ser útil determinar receptores adrenérgicos (β_2 y α_2 principalmente), receptores para NGF (trkA y p75^{NTR}) y receptores para E₂ (ER $_{\alpha}$, ER $_{\beta}$, GPR30), en éste último caso para descartar o no su participación en el proceso de reinervación del ovario.

Todo esto, debido a que entendiendo los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de reinervación pudiese ayudar a entender e interpretar mejor los resultados obtenidos y junto con ello evaluar si la denervación, tal como es planteada por algunos autores, efectivamente permite recuperar la funcionalidad ovárica. Por lo demás, podría aportar mayor información acerca de qué está ocurriendo en el ovario durante esta etapa que hace que vaya irremediabilmente perdiendo la capacidad reproductiva.

7. Bibliografía

Acuña E, Fornes R, Fernandois D, Garrido MP, Greiner M, Lara HE, Paredes AH. Increases in norepinephrine release and ovarian cyst formation during ageing in the rat. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009 Jun;16:7:64

Acuña E.(2009) Efecto del factor de crecimiento nervioso y su receptor p75NTR en el desarrollo folicular en la rata al final del periodo reproductivo.Memoria para optar al título de Bioquímico. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas,Laboratorio Neurobioquímica .

Aguado LI, Petrovic SL, Ojeda SR. Ovarian β -adrenergic receptors during the onset of puberty: Characterization, distribution, and coupling to steroidogenic responses. *Endocrinology*. 1982 Apr;110(4):1124-1132.

^a**Aguado LI**, Ojeda SR. Prepubertal ovarian function is finely regulated by direct adrenergic influences. role of noradrenergic innervation. *Endocrinology*. 1984 May;114(5):1845-1853.

^b**Aguado, LI.**; Ojeda S R. Ovarian adrenergic nerves play a role in maintaining preovulatory steroid secretion. *Endocrinology*. 1984 May;114(5):1944-1946.

Aguado LI. Role of the central and peripheral nervous system in the ovarian function. *Microsc Res Tech*. 2002 Dec;59(6):462-473.

Aloe L, Rocco ML, Bianchi P, Manni L. Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use. *J Transl Med*. 2012 Nov;10(1):239.

Baljet B.; Drukker J. The extrinsic Innervation of the abdominal organs in the female rat. *Acta Anat (Basel)*. 1979;104 (3):243-267.

Barria A, Leyton V, Ojeda SR, Lara HE. Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology*. 1993 Dec;133(6):2696-2703.

Berga S, Naftolin F. Neuroendocrine control of ovulation. *Gynecol Endocrinol*. 2012 Mar;28(SUPPL.1):9-13.

Binder AK, Rodriguez KF, Hamilton KJ, Stockton PS, Reed CE, Korach KS. The absence of ER- β results in altered gene expression in ovarian granulosa cells isolated from in vivo preovulatory follicles. *Endocrinology*. 2013 Jun;154(6):2174-2187.

Burden HW. Adrenergic innervation in ovaries of the rat and guinea pig. *Am J Anat*. 1972 Apr;133(4):455-461

Carter BD, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Offenhauser N, Bohm-Matthaei R, Baeuerle PA, Barde YA. Selective activation of NF- κ B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science*. 1996 Apr;272(5261):542-545.

Chao M V., Hempstead BL. p75 and Trk: A two-receptor system. *Trends Neurosci*. 1995 Jul;18(7):321-326.

Chávez-Genaro R, Lombide P, Domínguez R, Rosas P, Vázquez-Cuevas F. Sympathetic pharmacological denervation in ageing rats: Effects on ovulatory response and follicular population. *Reprod Fertil Dev*. 2007;19(8):954-960.

Christensen A, Bentley GE., Cabrera R, Ortega HH, Perfito N, Wu TJ, Micevych P. Hormonal Regulation of Female Reproduction. *Horm Metab Res*. 2012 Jul;44(8):587-591.

Cruz G, Fernandois D, Paredes AH. Ovarian function and reproductive senescence in the rat: Role of ovarian sympathetic innervation. *Reproduction*. 2017 Feb;153(2):R59-R68.

Deroo BJ, Rodríguez KF, Couse JF, Hamilton KJ, Collins JB, Grissom SF, Korach ks. Estrogen receptor beta is required for optimal cAMP production in mouse granulosa cells. *Mol Endocrinol*. 2009 Jul; 23(7):955-65

Dissen GA, Hill DF, Costa ME, Ma YJ, Ojeda SR. Nerve growth factor receptors in the peripubertal rat ovary. *Mol Endocrinol*. 1991 Nov;5(11):1642-1650.

Dissen GA, Hirshfield AN, Malamed S, Ojeda SR. Expression of neurotrophins and their receptors in the mammalian ovary is developmentally regulated : changes at the time of folliculogenesis. *Endocrinology*. 1995 Oct;136(10):4681-92.

^a**Dissen GA**, Hill DF, Costa ME, Les Dees CW, Lara HE, Ojeda SR. A role for trkA nerve growth factor receptors in mammalian ovulation. *Endocrinology*. 1996 Jan;137(1):198-209.

^b**Dissen GA**, Mayerhofer A, Ojeda SR. Participation of nerve growth factor in the regulation of ovarian function. *Zygote*. 1996 Nov;4(4):309-312.

Dissen GA, Lara HE, Leyton V, Paredes A, Hill DF, Costa ME, Martínez-Serrano A, Ojeda SR. Intraovarian excess of nerve growth factor increases androgen secretion and disrupts estrous cyclicity in the rat. *Endocrinology*. 2000 Mar;141(3):1073-1082.

Doganay M, Simsek A, Tapisiz OL, Mulazimoglu BS, Yumusak N, Gungor T. Superior ovarian nerve (SON) transection leads to stunted follicular maturation: a histomorphologic and morphometric analysis in the rat model. *Fertil Steril*. 2010 Mar;93(5):1711-1714.

El-Maasarany S, Brandt ME., Majercik MH., Zimniski SJ., Puett D. Immunocytochemical Localization of Rat Ovarian and Enzymatic Distribution Aromatase '. *Biol Reprod.* 1991Mar;44(3):550-560.

Erickson G, Magoffin DA, Dyer CA, Hofeditz C. The Ovarian Androgen Producing Cells: A Review of Structure/Function Relationships. *Endocr Rev.* 1985;6(3):371-399.

Fernandois D, Lara HE, Paredes AH. Blocking of β -adrenergic receptors during the subfertile period inhibits spontaneous ovarian cyst formation in rats. *Horm Metab Res.* 2012 Sep;44(9):682-687.

Forneris ML, Aguado LI. Neonatal superior ovarian nerve transection disturbs the cyclic activity of the female rats. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002 Sep;82(1):75-82.

Friedman WJ, Greene LA. Neurotrophin signaling via Trks and p75. *Exp Cell Res* 1999 Nov; 253(1):131-42.

Fuentes A, Jesam C, Devoto L, et al. Postergación de la maternidad en Chile: Una realidad oculta. *Rev Med Chil.* 2010;138(10):1240-1245.

Gerendai I, Tóth IE, Boldogkoi Z, Medveczky I, Halász B. Neuronal labeling in the rat brain and spinal cord from the ovary using viral transneuronal tracing technique. *Neuroendocrinology.* 1998;68(4):244-256.

Gerendai I, Kocsis K, Halász B. Supraspinal connections of the ovary: Structural and functional aspects. *Microsc Res Tech.* 2002 Dec;59(6):474-483

Greiner M, Paredes A, Araya V, Lara HE. Role of stress and sympathetic innervation in the development of polycystic ovary syndrome. *Endocrine.* 2005 Dec;28(3):319-324.

Greiner M, Paredes A, Rey-Ares V, Saller S, Mayerhofer A, Lara HE. Catecholamine uptake, storage, and regulated release by ovarian granulosa cells. *Endocrinology.* 2008 Oct;149(10):4988-4996.

Hanada T, Uchida S, Hotta H, Aikawa Y. Number, size, conduction, and vasoconstrictor ability of unmyelinated fibers of the ovarian nerve in adult and aged rats. *Auton Neurosci.* 2011 Oct 28;164(1-2):6-12.

Hantzopoulos PA, Suri C, Glass DJ, Goldfarb MP, Yancopoulos GD. The low affinity NGF receptor, p75, can collaborate with each of the Trks to potentiate functional responses to the neurotrophins. *Neuron.* 1994 Jul;13(1):187-201.

Heider U, Pedal I, Spanel-Borowski K. Increase in nerve fibers and loss of mast cells in polycystic and postmenopausal ovaries. *Fertil Steril.* 2001 Jun;75(6):1141-1147.

Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Strom A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev.* 2007 Jul; 87(3):905-31

Huang EJ, Reichardt LF. Trk Receptors: Roles in Neuronal Signal Transduction. *Annu Rev Biochem.* 2003;72(1):609-642

Itoh MT, Ishizuka B. α 1-Adrenergic receptor in rat ovary: Presence and localization. *Mol Cell Endocrinol.* 2005 Aug 30;240(1-2):58-63.

Kanda N, Watanabe S. 17β -Estradiol Enhances the Production of Nerve Growth Factor in THP-1-Derived Macrophages or Peripheral Blood Monocyte-Derived Macrophages. *J Invest Dermatol.* 2003 Oct;121(4):771-780.

Kawakami M, Kubo K, Uemura T, Nagase M, Hayashi R. Involvement of ovarian innervation in steroid secretion. *Endocrinology.* 1981Jul;109(1):136-145.

Klein CM, Burden HW. Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neurosci Lett.* 1988;85(2):217-222.

Kliachko S, Zor U. Increase in catecholamine-stimulated cyclic AMP and progesterone synthesis in rat granulosa cells during culture. *Molecular and cellular endocrinology.* 1981 Jul; 23(1): 23-32

Kohn J, Aloyz RS, Toma JG, Haak-Frendscho M, Miller FD. Functionally antagonistic interactions between the TrkA and p75 neurotrophin receptors regulate sympathetic neuron growth and target innervation. *J Neurosci.* 1999 Jul;19(13):5393-5408..

Kumar A, Banerjee A, Singh D, Thakur G, Kasarpalkar N, Gavali S, Gadkar S, Madam T, Mahale SD, Balasinor NH, Sachdeva G. Estradiol : A Steroid with Multiple Facets. *Horm Metab Res* 2018 May; 50(5): 359-374.

^a**Lara H**, Hill DF, Katz KH, Ojeda SR. The gene encoding nerve growth factor is expressed in the immature rat ovary: Effect of denervation and hormonal treatment. *Endocrinology.* 1990 Jan;126(1):357-63.

^b**Lara HE**, McDonald JK, Ojeda SR. Involvement of Nerve Growth Factor in Female Sexual Development. *Endocrinology.* 1990 Jan;126(1):364-375.

^c**Lara HE**, McDonald JK, Ahmed CE, Ojeda SR. Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and function in rats. *Endocrinology.* 1990 Nov;127(5):2199-2209.

Lara HE, Dees WL, Hiney JK, Dissen GA, Rivier C, Ojeda SR. Functional recovery of the developing rat ovary after transplantation: Contribution of the extrinsic innervation. *Endocrinology.* 1991Oct;129(4):1849-1860

Lara HE, Ferruz JL, Luza S, Bustamante DA, Borges Y, Ojeda SR. Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology*. 1993;133(6):2690-2695.

Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL, Ojeda SR. An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology*. 2000 Mar;141(3):1059-1072.

Lara HE, Dorfman M, Venegas M, Luza SM, Luna SL, Mayerhofer A, Guimaraes MA, Rosa E Silva AA, Ramírez VD. 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*. 2002 Dec;59(6):495-502.

Lawrence IE, Burden HW. The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *Anat Rec*. 1980 Jan;196(1):51-59.

Manni L, Holmang A, Cajander S, Lundeberg T, Aloe E, Stener-Victorin E. Effect of anti-NGF on ovarian expression of $\alpha 1$ - and $\beta 2$ -adrenoceptors, TrkA, p75 NTR, and tyrosine hydroxylase in rats with steroid-induced polycystic ovaries. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006 Mar;290: R826–R835.

Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian J Biol*. 2002 Nov;62(4a):609-614.

Mathews TJ, Hamilton BE. Mean Age of Mothers is on the Rise: United States, 2000-2014. *NCHS Data Brief*. 2016;(232):1-8.

Mayerhofer A, Dissen GA, Costa ME, Ojeda SR. A role for neurotransmitters in early follicular development: Induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology*. 1997 Aug;138(8):3320-3329.

McGee EA, Hsueh AJW. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev*. 2000 Apr;21(2):200-214

Mcneill DL, Burden HW. Neuropeptide Y and somatostatin immunoreactive perikarya in preaortic ganglia projecting to the rat ovary. *J. Reprod. Fertil* (1986) Nov;78(2):727-732

Micevych PE, Mermelstein PG, Sinchak K. Estradiol Membrane-Initiated Signaling in the Brain Mediates Reproduction. *Trends Neurosci*. 2017 Nov;40(11):654-666.

Mouzon J De. In-vitro fertilization : influence of women ' s age on pregnancy rates. 1990 Jan;5(1):56-59.

Morales L, Chávez R, Ayala ME, Domínguez R. Effects of unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in prepubertal rats on the ovulatory response to gonadotrophin administration. *J Endocrinol.* 1998 Aug;158(2):213-219.

Morales-Ledesma L, Trujillo A, Apolonio J. In the pubertal rat, the regulation of ovarian function involves the synergic participation of the sensory and sympathetic innervations that arrive at the gonad. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015Jun;13:61.

Nance DM, Burns J, Klein CM, Burden HW. Afferent fibers in the reproductive system and pelvic viscera of female rats: Anterograde tracing and immunocytochemical studies. *Brain Res Bull.* 1988 Oct;21(4):701-709.

Ojeda SR, Romero C, Tapia V, Dissen GA. Neurotrophic and cell-cell dependent control of early follicular development. *Mol Cell Endocrinol.* 2000 May;163(1-2):67-71.

Otten U, Schwab M, Gagnon C, Thoenen H. Selective induction of tyrosine hydroxylase and dopamine beta-hydroxylase by nerve growth factor: comparison between adrenal medulla and sympathetic ganglia of adult and newborn rats. *Brain Res.* 1977 Sep;133(2):291-303

Paccola CC, Resende CG, Stumpp T, Miraglia SM, Cipriano I. The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. *Anim Reprod.* 2013 Dec;10(4):677-683.

Paredes AH, Acuña E, Fornes R, Lara HE. Increased Intraovarian levels of noradrenaline and NGF precede the follicular changes in the rat ovary at the end of reproductive period. Congreso Europeo de Endocrinología (9, 28 abril 2007-02 Mayo 2007, Budapest, Hungría).

Pastelín CF, Rosas NH, Morales-Ledesma L, Linares R, Domínguez R, Morán C. Anatomical organization and neural pathways of the ovarian plexus nerve in rats. *J Ovarian Res.* 2017Mar;10(1):18.

Payer AF. Ultrastructural study of the nerve plexus accompanying the ovarian artery and vein in the rat. *Anat Rec.* 1978 Jan;190(1):47-63.

Plo I, Bono F, Bezombes C, Alam A, Bruno A, Laurent G. Nerve growth factor-induced protein kinase C stimulation contributes to TrkA-dependent inhibition of p75 neurotrophin receptor sphingolipid signaling. *J Neurosci Res.* 2004 Aug;77(4):465-474.

Prossnitz E., Arterburn JB., Sklar LA. GPR30: a G protein-coupled receptor for estrogen. *Mol Cell Endocrinol.* 2007 Feb ; 265-266: 138–142..

Rodríguez-Tébar A, Dechant G, Barde YA. Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron.* 1990Apr;4(4):487-492.

Salas C, Julio-Pieper M, Valladares M, Pommer R, Vega M, Mastronardi C, Kerr B, Ojeda SR, Lara HE, Romero C. Nerve growth factor-dependent activation of trkA receptors in the human ovary results in synthesis of follicle-stimulating hormone receptors and estrogen secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Jun;91(6):2396-2403.

Schmidt L, Sobotka T, Bentzen JG, Andersen AN. Demographic and medical consequences of the postponement of parenthood. *Hum Reprod Update.* 2012 Jan-Feb;18(1):29-43.

Sotomayor-Zárate R, Dorfman M, Paredes A, Lara HE. Neonatal Exposure to Estradiol Valerate Programs Ovarian Sympathetic Innervation and Follicular Development in the Adult Rat. *Biol Reprod.* 2008 Apr;78(4):673-680.

Tarlatzis BC, Zepiridis L. Perimenopausal conception. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Nov;997:93-104.

te Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive aging. *Hum Reprod Update.* 2002;8(2):141-154.

Toufexis D, Rivarola MA, Lara H, Viau V. RMA. Stress and the Reproductive Axis. *J Endocrinol.* 2014 Sep;26(9):573-586

Uchida S, Kagitani F. Effects of electrical stimulation of autonomic nerves to the ovary on the ovarian testosterone secretion rate in rats. *Auton Neurosci.* 2014 Feb;180(1):48-52.

Uchida S. Sympathetic regulation of estradiol secretion from the ovary. *Auton Neurosci.* 2015;187:27-35.

Uchida S, Kagitani F. Sympathetic regulation of ovarian functions under chronic estradiol treatment in rats. *Auton Neurosci.* 2016 May;197:19-24.

Waldenström U, Cnattingius S, Norman M, Schytt E. Advanced Maternal Age and Stillbirth Risk in Nulliparous and Parous Women. *Obstet Gynecol.* 2015 August;126(2):355-362.

Yamamoto R, Kawasaki H, Takasaki K. Postsynaptic alpha-adrenoreceptor populations in several vascular systems. *J Auton Pharmacol* 1984 Dec; 4(4):231-239.

Yaşar P, Ayaz G, User SD, Güpür G, Muyan M. Molecular mechanism of estrogen–estrogen receptor signaling. *Reprod Med Biol.* 2016 Dec;16(1):4-20.

8. Anexo

Registro de los ciclos estrales

Registro ciclo estral ratas en periodo fértil

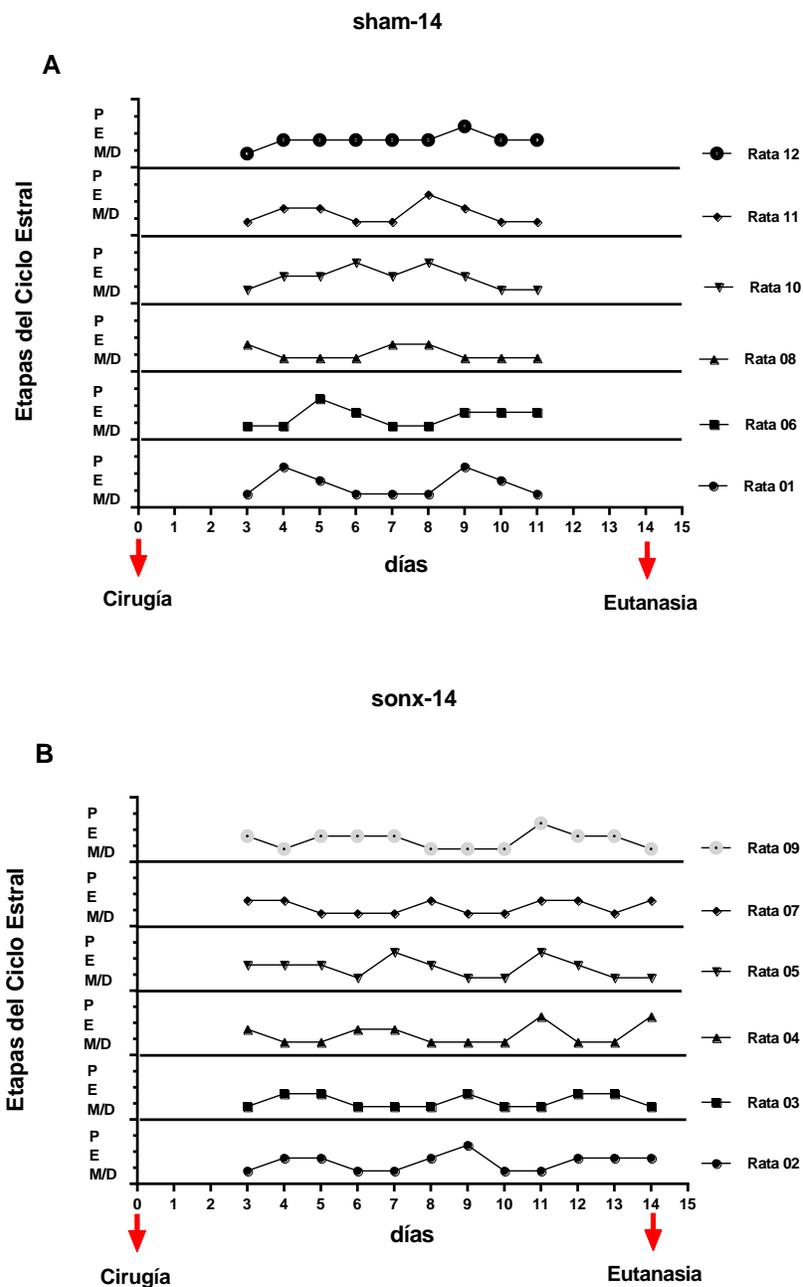


Figura 18: Registro del ciclo estral de las ratas en periodo fértil: El registro corresponde a los días transcurridos entre la cirugía y la eutanasia. A: sham14 y B: sonx14

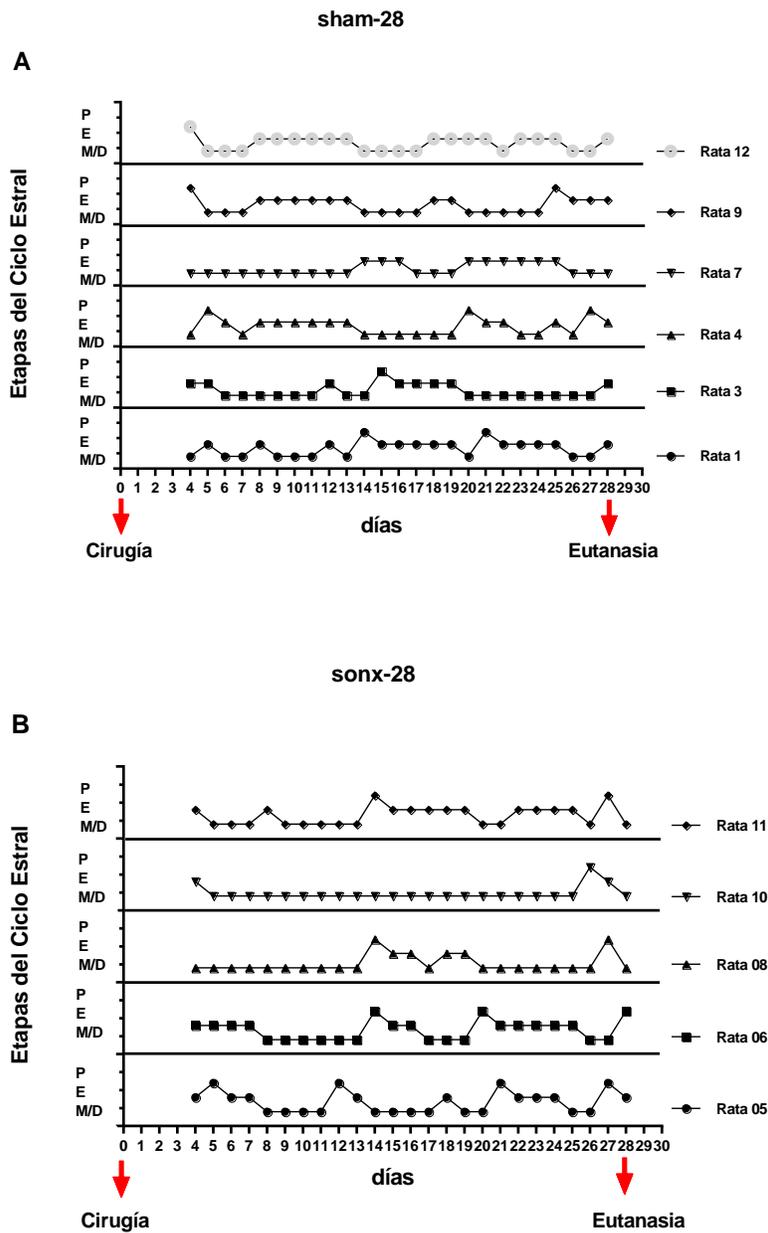


Figura 19: Registro del ciclo estral de las ratas en periodo fértil: El registro corresponde a los días transcurridos entre la cirugía y la eutanasia. A: sham y B: sonx28

Registro ciclo estral ratas en periodo subfétil

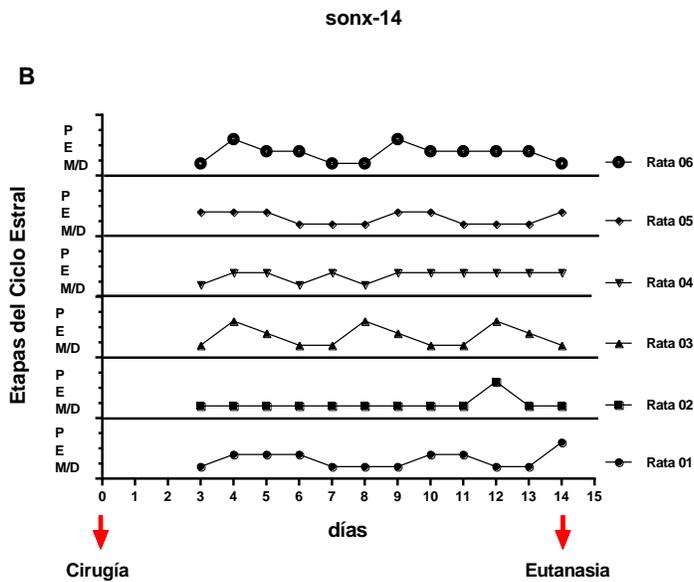
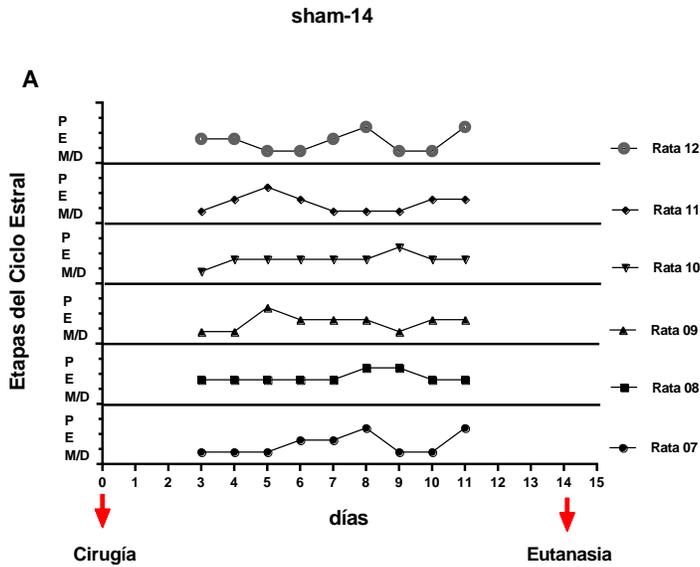


Figura 20: Registro del ciclo estral de las ratas en periodo subfétil: El registro corresponde a los días transcurridos entre la cirugía y la eutanasia. A: sham14 y B: sonx14

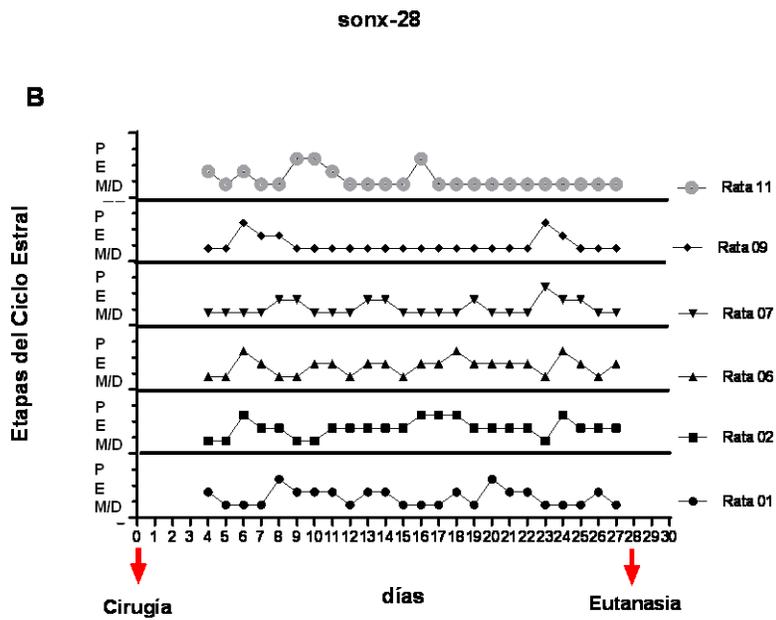
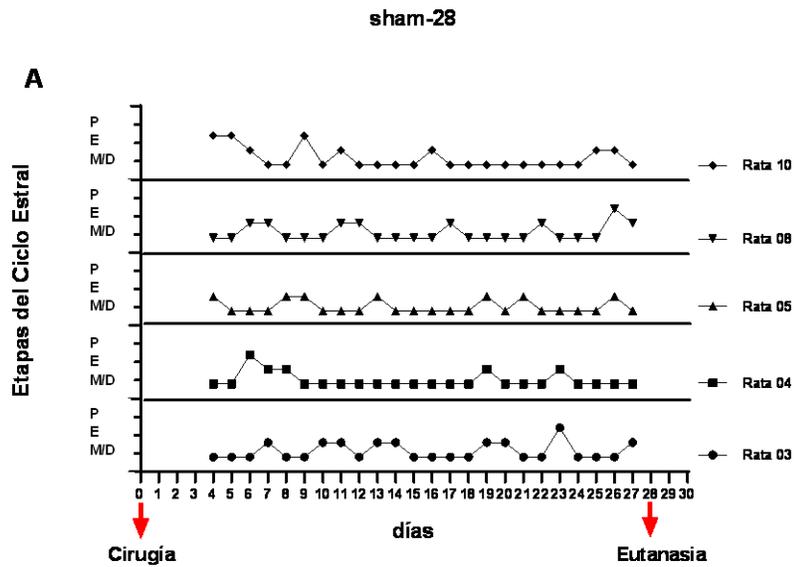


Figura 21: Registro del ciclo estral de las ratas en periodo subfétil: El registro corresponde a los días transcurridos entre la cirugía y la eutanasia. A: sham28 y B: sonx28

