

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



***LA ADMINISTRACIÓN INTRAOVÁRICA DE HUPERZINA-A  
REVIERTE LAS ALTERACIONES EN LA FUNCIÓN OVÁRICA  
INDUCIDAS POR ESTRÉS EN RATAS ADULTAS.***

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

***RAÚL CRISTÓBAL RIQUELME NECULPAN***

Director de Tesis: Dr. Hernán Lara Peñaloza

Santiago-CHILE

Octubre 2019

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**  
**INFORME DE APROBACIÓN**  
**TESIS DE DOCTORADO**

**Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis presentada por el candidato:**

**RAÚL CRISTÓBAL RIQUELME NECULPAN**

**Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Farmacología, en el examen de defensa de Tesis público rendido el día ..... de ..... del 2019.**

**Director de Tesis:**

**Dr. Hernán Lara P.**

\_\_\_\_\_

**Comisión Informante de Tesis:**

**Dra. Jenny L. Fiedler (Presidente)**

\_\_\_\_\_

**Dra. Carmen Romero O.**

\_\_\_\_\_

**Dr. Enrique Castellón V.**

\_\_\_\_\_

*Los anhelos más sinceros  
son aquellos que no pierden  
intensidad con el paso del tiempo.*

**Edward Elric**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Hernán Lara por la paciencia, dedicación y apoyo tanto en la planificación como en el desarrollo de esta tesis, y en especial por haber depositado su confianza en mi trabajo. Su tutoría y dedicación fue lo que me permitió llevar a cabo esta investigación.

Al Dr. Alfonso Paredes por su gran ayuda en los seminarios, por su paciencia y por sus consejos en los experimentos. A los integrantes del laboratorio de Neurobioquímica que me acompañaron durante este proceso: Valentina, Agustín, Fernanda, Constanza A, Constanza V, Sara, Andrea, Andrés, Miguel, Beatriz, Daniela, Matías y Ángela.

A la Dra. Fernanda Schäufler y a la Sra. Elsa Carrasco del Bioterio, por el cuidado y dedicación con los animales, y en especial a Freddy Ruz, quien con su trabajo permitió concretar experimentos fundamentales de esta investigación.

A mis amigos del Doctorado: Andrea, Matías, Ignacio, Maritza, Katherine, Daniela, Pablo y Aimeé por compartir penas y alegrías.

Al Dr. Ramón Sotomayor por haberme apoyado en mi decisión de seguir el camino de la ciencia y a la Dra. Leticia Luna, quien desde el pregrado sembró la semilla.

A mis amigos Nicole, Jaka, René, Cristian, Favian, Gilda, Leandro e Isabella, quienes han estado pendientes y apoyando este proceso, y Karina por su apoyo incondicional durante los primeros años.

A mi padre, mis abuelos y mis hermanos por el apoyo infinito y constante.

Un especial agradecimiento a Gonzalo Cruz quien desde siempre me ha incentivado a estudiar y a seguir sus pasos en el camino de la ciencia.

## **FINANCIAMIENTO**

La realización de esta tesis fue posible gracias al financiamiento de:

- Proyecto FONDECYT: N°1170291. Investigador Responsable: Dr. Hernán Lara Peñaloza.
- Beca de apoyo a la realización de tesis doctoral Conicyt N°21170073 – Becario Raúl Riquelme Neculpan.
- Beca de rebaja de arancel de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile

Fue realizada bajo la dirección del Dr. Hernán Lara P. en el Laboratorio de Neurobioquímica del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

## **PRESENTACIONES A CONGRESOS**

- **Participación en el International Workshop in Neuroendocrinology**

4th International Workshop in Neuroendocrinology. Hippocampus Resort – Concón, 6 al 9 de agosto 2017: “ACTIVATION OF THE INTRA-OVARIAN CHOLINERGIC SYSTEM REVERSES THE POLYCYSTIC OVARIAN PHENOTYPE INDUCED BY COLD STRESS IN THE RAT”, presentación de póster.

- **Participación en Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile (SOFARCHI).**

XXXIX Reunión Anual de la SOFARCHI Hotel Cabaña del Lago - Puerto Varas, 22 al 25 de noviembre 2017: “IN VIVO” PHARMACOLOGICAL INHIBITION OF OVARIAN ACETILCOLESTERASE REVERTS POLYCYTIC OVARY PHENOTYPE IN RAT., presentación oral dentro del simposio “NEURAL AND NON-NEURONAL FUNCTIONS OF ACETILCHOLINE IN NEUROENDOCRINE TISSUES”.

- **Participación en el World Congress of Basic and Clinical Pharmacology 2018 (WCP2018).**

18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology. Kyoto International Conference Center – Kyoto, Japan, 1 al 7 de Julio 2018: “EFFECT OF STRESS IN THE OVARIAN CHOLINERGIC SYSTEM, THE OVARIAN FUNCTION AND THE FERTILITY IN THE RAT.”, presentación de póster.

- **Presentación en la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo (SCHR)**

XXIX Reunión Anual de la SCHR Hippocampus Resort – Concón, 5 al 8 de Septiembre 2018: “EFFECT OF STRESS IN THE OVARIAN CHOLINERGIC SYSTEM, THE OVARIAN FUNCTION AND THE FERTILITY IN THE RAT.”, presentación de póster. **Premio a la mejor presentación de poster.**

## **PUBLICACIONES**

Parte de los resultados de esta tesis han dado origen a un artículo científico publicado en la revista Journal of Endocrinology, cuyo índice de impacto ISI es 4,381 a diciembre del 2018.

***“Role of ovarian sympathetic nerves and cholinergic local system during cold stress.”***

Riquelme R<sup>1</sup>, Ruz F<sup>1</sup>, Mayerhofer A<sup>2</sup>, Lara H<sup>1</sup>.

*J Endocrinol. 2019 Jun 1. pii: JOE-19-0125.R2. doi: 10.1530/JOE-19-0125*

<sup>1</sup> Center for Neurobiochemical studies in Endocrine Diseases, Laboratory of Neurobiochemistry, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, Universidad de Chile, Santiago, Chile

<sup>2</sup> Biomedical Center Munich (BMC), Cell Biology, Anatomy III, Ludwig-Maximilians-Universität München, Planegg-Martinsried, Germany

## ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....  | <b>10</b> |
| <b>ABREVIACIONES</b> .....  | <b>12</b> |
| <b>RESUMEN</b> .....  | <b>13</b> |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | <b>16</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....   | <b>19</b> |
| REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN OVÁRICA .....  | 19        |
| EFFECTO DEL ESTRÉS SIMPÁTICO Y DE LA REGULACIÓN COLINÉRGICA SOBRE LA FUNCIÓN OVÁRICA .....                        | 25        |
| <b>HIPÓTESIS</b> .....  | <b>28</b> |
| <b>OBJETIVO GENERAL</b> .....   | <b>28</b> |
| OBJETIVO ESPECÍFICO N°1 .....   | 28        |
| OBJETIVO ESPECÍFICO N°2 .....   | 29        |
| OBJETIVO ESPECÍFICO N°3 .....   | 30        |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....   | <b>31</b> |
| ANIMALES .....  | 31        |
| MODELO DE ESTRÉS OBJETIVO 1 .....   | 31        |
| MODELO DE ESTRÉS OBJETIVO2 .....  | 32        |
| MODELO EXPERIMENTAL .....   | 33        |
| DETERMINACIÓN DEL CICLO ESTRAL .....  | 34        |
| CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES INTRAOVÁRICOS DE ACH Y ACTIVIDAD ACHÉ .....   | 35        |
| CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES INTRAOVÁRICOS DE NA .....   | 36        |
| RT-PCR CUANTITATIVO .....   | 37        |
| MORFOMETRÍA .....   | 38        |
| DETERMINACIÓN DE TESTOSTERONA, ESTRADIOL Y PROGESTERONA POR ENZIMO INMUNO ENSAYO (EIA) .....                      | 39        |
| CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS Y ENSAYOS DE WESTERN BLOT .....   | 39        |
| EVALUACIÓN DE LA FERTILIDAD .....   | 40        |
| ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....  | 40        |
| <b>RESULTADOS</b> .....   | <b>41</b> |
| DETERMINACIÓN DE NA, ACH Y ACTIVIDAD ACHÉ EN RATAS SOMETIDAS A 4 SEMANAS DE ESTRÉS .....                          | 41        |
| DETERMINACIÓN DE NIVELES DE ARNM Y NIVELES PROTEICOS DE ACHÉ EN RATAS SOMETIDAS A ESTRÉS .....                    | 42        |
| DETERMINACIÓN DEL DESARROLLO FOLICULAR EN RATAS SOMETIDAS A ESTRÉS .....  | 44        |
| DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE HORMONAS ESTEROIDALES EN RATAS SOMETIDAS A ESTRÉS .....                           | 45        |
| CICLICIDAD ESTRAL DE RATAS SOMETIDAS A ESTRÉS .....   | 46        |
| EFFECTO DE LA OVARIECTOMÍA UNILATERAL EN EL PESO DEL OVARIO .....   | 47        |
| DETERMINACIÓN DE NA, ACH Y ACTIVIDAD ACHÉ EN RATAS TRATADAS CON HUP-A POSTERIOR A ESTRÉS .....                    | 48        |
| DETERMINACIÓN DE NIVELES DE ARNM Y NIVELES PROTEICOS DE ACHÉ EN RATAS TRATADAS CON HUP-A POSTERIOR A ESTRÉS ..... | 51        |



|   |           |
|---|-----------|
| DETERMINACIÓN DEL DESARROLLO FOLICULAR EN RATAS TRATADAS CON HUP-A POSTERIOR A ESTRÉS.....                | 54        |
| DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE HORMONAS ESTEROIDALES EN RATAS TRATADAS CON HUP-A POSTERIOR A ESTRÉS..... | 57        |
| CICLICIDAD ESTRAL EN RATAS TRATADAS CON HUP-A POSTERIOR A ESTRÉS.....                                     | 59        |
| CICLICIDAD ESTRAL Y FERTILIDAD DE RATAS TRATADAS CON HUP-A POSTERIOR A ESTRÉS ..                          | 60        |
| <b>DISCUSIÓN .....</b>  | <b>64</b> |
| <b>RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS .....</b>  | <b>77</b> |
| <b>CONCLUSIÓN GENERAL .....</b>   | <b>77</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>   | <b>78</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Secuencia esquemática del desarrollo folicular ovárico. ....  | 20 |
| <b>Figura 2.</b> Esquema de la regulación nerviosa simpática y endocrina del ovario. ....  | 22 |
| <b>Figura 3.</b> Hipótesis del balance entre el sistema simpático y el sistema colinérgico sobre el desarrollo folicular. ....   | 27 |
| <b>Figura 4.</b> Esquema de protocolo de estrés por frío de 4 semanas. ....  | 32 |
| <b>Figura 5.</b> Esquema de protocolo de estrés por frío, ovariectomía e implantación de minibomba osmótica. ....  | 33 |
| <b>Figura 6.</b> Protocolo de experimentos de Fertilidad. ....   | 34 |
| <b>Figura 7.</b> Esquema de ciclos estrales de 4 y 5 días. ....  | 35 |
| <b>Figura 8.</b> Efecto de la exposición a estrés por frío de 4 semanas en el contenido ovárico de Noradrenalina, Acetilcolina y en la actividad de la acetilcolinesterasa. .... | 41 |
| <b>Figura 9.</b> Efecto de la exposición a estrés por frío de 4 semanas sobre los niveles de ARNm de AChE total. ....  | 42 |
| <b>Figura 10.</b> Efecto de la exposición a estrés por frío de 4 semanas sobre los niveles proteicos de AChE total. ....   | 43 |
| <b>Figura 11.</b> Efecto de la exposición a estrés por frío de 4 semanas sobre los niveles proteicos de AChE total. ....   | 43 |
| <b>Figura 12.</b> Efecto de la exposición a estrés por frío de 4 semanas en el número de Folículos Secundarios, Folículos Antrales Sanos y Atrésicos y Cuerpos lúteos. ....      | 44 |
| <b>Figura 13.</b> Efecto de la exposición a estrés por frío de 4 semanas en los niveles plasmáticos de Testosterona, Estradiol y Progesterona. ....                              | 45 |
| <b>Figura 14.</b> Gráficos representativos de los ciclos estrales de ratas control y Estrés de 4 semanas. ....   | 46 |
| <b>Figura 15.</b> Número de ciclos estrales contados durante el periodo de 28 días de estrés. ....   | 47 |
| <b>Figura 16.</b> Peso del ovario al final del periodo de estrés y peso del ovario posterior a ovariectomía unilateral. ....   | 47 |
| <b>Figura 17.</b> Efecto temporal del estrés y el tratamiento farmacológico con Huperzina-A sobre el contenido de NA ovárica. ....   | 48 |
| <b>Figura 18.</b> Efecto temporal del estrés y el tratamiento farmacológico con Huperzina-A sobre el contenido de ACh ovárica. ....  | 49 |
| <b>Figura 19.</b> Efecto temporal del estrés y el tratamiento farmacológico con Huperzina-A sobre la actividad de la AChE. ....  | 50 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 20.</b> Efecto de la exposición a estrés por frío de 4 semanas y tratamiento farmacológico sobre los niveles de ARNm de AChE. ....  | 51 |
| <b>Figura 21.</b> Efecto de la exposición a estrés por frío de 4 semanas y tratamiento farmacológico sobre los niveles proteicos de AChE total.....   | 52 |
| <b>Figura 22.</b> Efecto de la exposición a estrés por frío de 4 semanas y tratamiento farmacológico sobre los niveles proteicos de AChE total.....   | 53 |
| <b>Figura 23.</b> Imágenes representativas de un corte central de los ovarios de ratas pertenecientes a los grupos Control-Sham, Estrés-Sham, Estrés-Hup-A y Estrés- Hup-A -Atropina .....                        | 54 |
| <b>Figura 24.</b> Efecto de la exposición a estrés por frío de 4 semanas seguido de tratamiento farmacológico sobre el porcentaje de estructuras foliculares.....   | 56 |
| <b>Figura 25.</b> Efecto de la exposición a estrés por frío de 4 semanas seguido de tratamiento farmacológico sobre los niveles plasmáticos de T, E <sub>2</sub> , Razón T/ E <sub>2</sub> y P <sub>4</sub> ..... | 58 |
| <b>Figura 26.</b> Ciclos representativos de los grupos sometidos a el protocolo de fertilidad. ....   | 59 |
| <b>Figura 27.</b> Número de ciclos estrales.....  | 60 |
| <b>Figura 28.</b> Ciclos representativos de los grupos sometidos a el protocolo de fertilidad . ....  | 61 |
| <b>Figura 29.</b> Tasa de Fertilidad entre ratas Infértiles y ratas fértiles.....   | 62 |
| <b>Figura 30.</b> Fotografías representativas de los cuernos uterinos.....  | 62 |
| <b>Figura 31.</b> Número de implantes y Número de crías nacidas vivas.....  | 63 |
| <b>Figura 32.</b> Efecto temporal del estrés por frío en el Sistema simpático y el Sistema colinérgico local.....   | 75 |
| <b>Figura 33.</b> Efecto de la administración crónica de Hup-A post estrés sobre los niveles de NA y ACh. ....  | 76 |

## ABREVIACIONES

|       |   |
|-------|---|
| ACh   | Acetilcolina                            |
| AChE  | Acetilcolinesterasa                     |
| ChAT  | Colina acetiltransferasa                |
| CG    | Células de la granulosa                 |
| D     | Diestro                                 |
| E     | Estro                                   |
| E2    | Estradiol                               |
| FSH   | Hormona folículo estimulante            |
| GnRH  | Hormona liberadora de gonadotrofinas    |
| HHO   | Eje Hipotálamo-hipófisis-ovario         |
| Hup-A | Huperzina-A                             |
| LH    | Hormona lutenizante                     |
| MHPG  | 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol           |
| MR    | Receptor muscarínico                    |
| NA    | Noradrenalina                           |
| OVX   | Ovariectomía                            |
| P     | Proestro                                |
| P4    | Progesterona                            |
| PCOS  | Síndrome de ovario poliquístico         |
| PO    | Plexo ovárico                           |
| SON   | Nervio ovárico superior                 |
| SOP   | Síndrome de ovario poliquístico         |
| T     | Testosterona                            |
| vChAT | Transportador vesicular de acetilcolina |

## RESUMEN

El Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) es la causa más común de infertilidad de origen ovárico. Esta patología se manifiesta como una disfunción endocrino-metabólica que se caracteriza por la presencia de amenorrea, aumento en los niveles de andrógenos, hirsutismo y ovarios de mayor tamaño con la presencia de numerosos quistes foliculares, alteraciones metabólicas, hipertensión, apnea, etc. Para conocer las múltiples características fisiopatológicas del síndrome, se ha hecho necesario el desarrollo de modelos animales que permitan integrarlas en un modelo de esta patología. Nuestro grupo de trabajo ha desarrollado experimentalmente el concepto -- demostrado en ratas y en humanos --, que la sobrecarga simpática tiene un papel causal importante en su desarrollo.

Un aumento en el tono simpático por exposición crónica a estrés por frío induce un fenotipo similar a la condición de ovario poliquístico, caracterizado por una disminución de los folículos pre-antrales, aumento de folículos antrales con hipertecosis, quistes ováricos e hiperandrogenismo. Sin embargo, se desconoce el efecto del estrés simpático sobre la fertilidad de la rata hembra.

El ovario, al igual que todos los órganos periféricos está sujeto a regulación simpática y parasimpática. Este órgano recibe inervación vagal, sin embargo, las fibras nerviosas parasimpáticas que inervan al ovario no lo hacen directamente al folículo ovárico, si no que ingresan por la región hiliar y se asocian a vasos sanguíneos, a diferencia de los nervios simpáticos que se asocian a folículos ováricos en todas las etapas del desarrollo. Curiosamente, en las células de granulosa del folículo ovárico de humanos y primates, se ha descrito un sistema colinérgico local, encontrándose receptores muscarínicos M1, M3 y M5, acetilcolina (ACh), colina acetiltransferasa (ChAT), transportador neuronal y de membrana para

ACh y la enzima que lo degrada, la Acetilcolinesterasa (AChE). Esta descrito en ovario de rata la presencia de receptores muscarínicos y AChE, y esta descrito que el tratamiento crónico local in vivo con Huperzina-A (Hup-A) (inhibidor de AChE) mediante minibombas osmóticas, aumenta el número de cuerpos lúteos, y disminuye el número de quistes en rata, comparado con un animal al cual se le realiza la intervención, pero sin instalar la minibomba osmótica (Sham). Por lo tanto, dado que el estrés por sobrecarga simpática produce el fenotipo similar al SOP, sería posible que el sistema colinérgico local del ovario jugara un papel antagónico en el desarrollo folicular frente a la sobrecarga simpática del estrés. Por todo lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar si **LA ADMINISTRACIÓN INTRAOVÁRICA DE HUPERZINA-A REVIERTE LAS ALTERACIONES EN LA FUNCIÓN OVÁRICA INDUCIDAS POR ESTRÉS EN RATAS ADULTAS**. Usamos ratas hembras virgenes sprague dawley que se expusieron a estrés por frío durante cuatro semanas, posteriormente se hemiovarioectomización y se implantó una minibomba osmótica con fármaco (Hup-A o Hup-A y atropina) que administró fármaco durante 28 días o se sometió a la cirugía, pero sin la administración del fármaco (Sham). Al final del procedimiento se recolectaron los ovarios y el plasma, además de realizar experimentos de fertilidad. Durante todo el procedimiento se siguió la ciclicidad estral, determinando indirectamente el número de ovulaciones de los ciclos. Se midieron los niveles plasmáticos de hormonas esteroidales. Los ovarios se utilizaron para medir neurotransmisores y realizar un análisis morfométrico de estructuras foliculares para determinar la dinámica del desarrollo folicular. Finalmente, se midió la fertilidad de estas ratas. Los resultados mostraron que el estrés aumenta los niveles de noradrenalina (NA) y ACh, y frente a este aumento, predomina la NA produciendo alteraciones en la función ovárica como

disminución de los ciclos, alteraciones en el desarrollo folicular (disminución de cuerpos lúteos y aparición de quistes), hiperandrogenismo e infertilidad. La administración de Hup-A aumenta los niveles de ACh, pero también aumenta los niveles de NA aún más, revirtiendo parcialmente las alteraciones en la función ovárica, aumentando los ciclos, disminuyendo quistes y restableciendo los niveles de Testosterona (T), pero no aumenta la fertilidad. Estos resultados contribuyen a consolidar la regulación del sistema colinérgico local como una herramienta para revertir alteraciones ováricas. La búsqueda de nuevos fármacos específicos para los receptores nicotínicos y que no produzcan estimulación simpática contribuirán a un nuevo enfoque farmacológico complementario para el tratamiento del SOP.

## **ABSTRACT**

Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS) is the most common cause of ovarian infertility. This pathology manifests as an endocrine-metabolic dysfunction, characterized by the presence of amenorrhea, increased plasma levels of androgens, hirsutism and ovaries with the presence of numerous medium size follicular cyst, metabolic disorders, hypertension, apnea, etc. To know the multiple physiopathological characteristics of the syndrome, the development of animal models is necessary. Our working group has experimentally developed the concept that sympathetic overload plays an important causal role in its development.

An increase in sympathetic tone due to chronic exposure to cold stress, induces a phenotype similar to the polycystic ovarian condition, characterized by a decrease in pre-antral follicles, an increase in antral follicles with hyperthecosis, ovarian cysts and hyperandrogenism. However, the effect of sympathetic stress on female fertility is unknown.

The ovary, like all peripheral organs, is under sympathetic and parasympathetic regulation. This organ receives vagal innervation, however, parasympathetic nerve fibers that innervate the ovary do not directly organize around the ovarian follicle but enter through the hilar region and are associated with blood vessels, unlike the sympathetic nerves that are associated with Ovarian follicles at all stages of development. Interestingly, in the granulosa cells of the ovarian follicle of humans and primates, a local cholinergic system has been described, being muscarinic receptors M1, M3 and M5, acetylcholine (ACh), choline acetyltransferase (ChAT), neuronal and membrane transporter for ACh and the enzyme that degrades it, acetylcholinesterase (AChE). The presence of muscarinic receptors and AChE was demonstrated in rat ovary, and it was described that local chronic treatment in vivo



with Huperzine-A (AChE inhibitor) by means of osmotic minipumps, increases the number of corpora lutea, and decreases the number of cysts in rat, compared with an animal to which the intervention is performed, but without installing the osmotic minipump (Sham). Therefore, given that sympathetic overload stress produces the phenotype similar to PCOS, it would be possible that the local cholinergic system of the ovary played an antagonistic role in follicular development against the sympathetic overload of stress. For all the above, the objective of this work was to determine if **INTRAOVARIAN ADMINISTRATION OF HUPERZINE-A REVERSES ALTERATIONS IN THE OVARIAN FUNCTION INDUCED BY STRESS IN ADULT RATS**. We used Sprague Dawley rats that were exposed to cold stress for four weeks, then hemiovarioectomy was done and an osmotic minipump with drug (Hup-A or Hup-A and atropine) was implanted during 28 days or underwent sham surgery. At the end of the procedure, ovaries and plasma were collected. In addition, in other group of sham or stressed rats we did fertility experiments. Throughout the procedure the estrual cyclicity was followed, indirectly determining the number of ovulations by the number of estrual cycles. Plasma levels of steroidal hormones were measured. The ovaries were used to measure neurotransmitters and perform a morphometric analysis of follicular structures to determine the dynamics of follicular development. Finally, the fertility of these rats was measured. The results showed that stress increases both the levels of NA and ACh, but NA predominates producing alterations in ovarian function such as decreased cycles, alterations in follicular development (decrease in corpora lutea and appearance of cysts), hyperandrogenism and infertility. The administration of Hup-A increases the ACh levels, but also the NA levels even more, partially reversing the alterations in the ovarian function, improves the cycles, decreases cysts and restores Testosterone

levels (T), but does not increase the fertility. These results have consolidated the regulation of the local cholinergic system as a tool to revert ovarian alterations. The search for new specific drugs for nicotinic receptors and that do not produce sympathetic stimulation will contribute to a new complementary pharmacological approach for the treatment of PCOS.

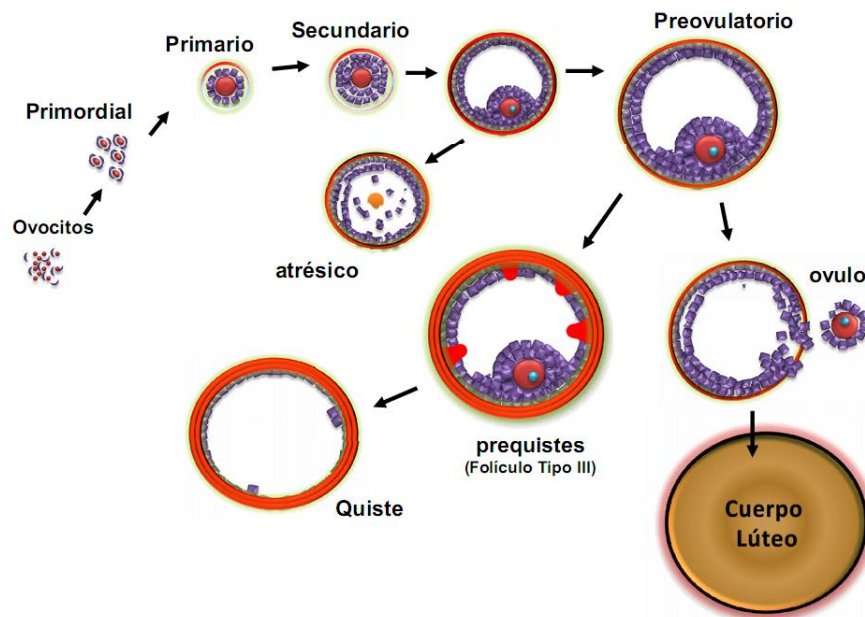
## **INTRODUCCIÓN**

### **Regulación de la función ovárica**

La reproducción es uno de los procesos fundamentales para la sobrevivencia de las especies. En la hembra los gametos se encuentran contenidos en los ovarios dentro de estructuras llamadas folículos ováricos. En la actualidad, uno de los problemas más prevalentes asociados al correcto desarrollo de los folículos y la ovulación es el síndrome de ovario poliquístico (SOP), que además se asocia a alteraciones de tipo metabólico.

Los ovarios tienen como función la síntesis de hormonas esteroidales y peptídicas y además, proporcionan el ambiente adecuado para el desarrollo, diferenciación y liberación del ovocito maduro mediante la folículoogénesis (McGee and Hsueh, 2000). La folículoogénesis se inicia con el crecimiento de una cohorte de folículos primordiales, el ovocito crece y las células de pregranulosa cambian de forma plana a cuboidal convirtiéndose en folículos primarios. Cuando estos folículos comienzan a crecer y las células de la granulosa proliferan y la teca se organiza se forman los folículos secundarios. Las células foliculares producen líquido que contiene proteínas, electrolitos y hormonas, el que se acumula en los espacios intercelulares de la granulosa, formando un antro, de estos folículos antrales un folículo dominante aumentará de tamaño para denominarse folículo preovulatorio y sólo uno de todos los reclutados ovulará. Las células de la granulosa de dicho folículo se diferencian y luteinizan, formando el cuerpo lúteo, que secreta activamente progesterona. El resto de los folículos reclutados, se degeneran en un proceso

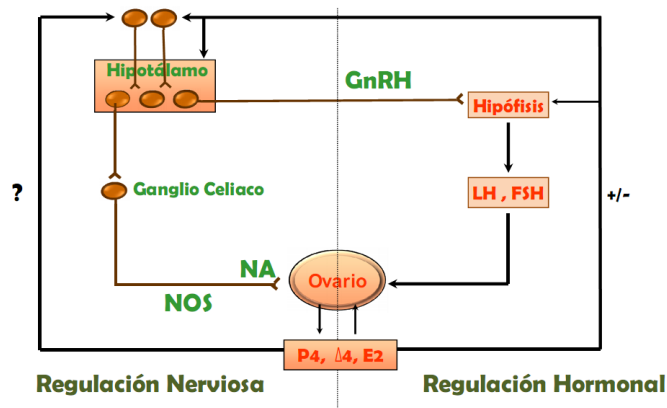
llamado atresia, que involucra apoptosis o muerte celular programada. A veces este proceso no ocurre correctamente, y algunos folículos persisten, llenándose de líquido y ocupando un volumen considerable dentro del ovario, dichas estructuras son denominadas estructuras quísticas (En ratas, folículos tipo III, prequistes y quistes(Brawer et al., 1986)), las que impiden el funcionamiento normal del ovario (McGee and Hsueh, 2000).



**Figura 1.** Secuencia esquemática del desarrollo folicular ovárico. El desarrollo folicular se inicia con el crecimiento de una cohorte de folículos primordiales, los cuales crecen y pasan a formar folículos primarios. Posteriormente, las células de la granulosa proliferan y la teca comienza a organizarse, formando folículos secundarios. Las células foliculares producen líquido que contiene proteínas, electrolitos y hormonas, formando un antro, razón por la cual, los folículos adquieren el nombre de antrales. De ellos, existirá un folículo dominante que aumenta de tamaño para denominarse folículo preovulatorio y sólo uno de todos los reclutados, libera el ovocito hacia el oviducto, fenómeno conocido como ovulación. Las células de la granulosa de dicho folículo se diferencian y luteinizan, formando el cuerpo lúteo, que secreta activamente progesterona. El resto de los folículos reclutados, se degeneran en un proceso llamado atresia (folículos atrésicos), que involucra apoptosis o muerte celular programada. A veces este proceso no ocurre correctamente, y algunos folículos persisten, llenándose de líquido y ocupando un volumen considerable dentro del ovario, dichas estructuras son denominadas estructuras quísticas (En ratas, folículos tipo III, pre-quistes y quistes), las que impiden el funcionamiento normal del ovario).

Las funciones del ovario están reguladas por señales neuroendocrinas del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario (HHO). El Hipotálamo libera de manera pulsátil el factor liberador de gonadotrofinas (GnRH) y a través del sistema porta hipofisiario alcanza la adenohipófisis estimulando la síntesis y liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) en el gonadotrofo (Ojeda, 2012, Uchida, 2015). La FSH regula principalmente la foliculogénesis y la secreción de estradiol a través de la activación de la enzima aromatasa. Por otro lado, la LH es esencial para el proceso de ovulación (Havelock et al., 2004). Este complejo eje es regulado por mecanismos de retroalimentación positiva y negativa, lo que permite la liberación de GnRH desde el Hipotálamo y también regula la secreción de gonadotrofinas desde la hipófisis (Fox et al., 1990). Además de la regulación endocrina, existe un mecanismo regulatorio nervioso que parte de las fibras nerviosas simpáticas postganglionares que conforman el plexo ovárico (PO) (Aguado, 2002, Lara et al., 2002) y el nervio ovárico superior (SON). Las fibras del PO alcanzan una distribución perivascular y el SON inerva directamente las células de la teca de los folículos ováricos en crecimiento, por lo que se ha asociado su función nerviosa con la síntesis de esteroides (Lara et al., 2002, Manni et al., 2005, Rosas et al., 2018).

## Regulación de la función ovárica



**Figura 2.** Esquema de la regulación nerviosa simpática y endocrina del ovario. La función ovárica es regulada a través de dos vías: a) el tradicional eje hormonal, que comienza en el hipotálamo, desde donde se secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la que actúa sobre la hipófisis anterior para inducir la liberación de gonadotropinas, hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH). La otra vía reguladora es de origen nervioso. El ovario recibe inervación desde el hipotálamo, desde donde presenta varios relevos neuronales hasta llegar al ganglio celiaco, donde el SON inerva distintos componentes estructurales del ovario, incluyendo tejido intersticial y los folículos en desarrollo. Ambas vías estimulan las células del ovario, para regular los procesos de desarrollo folicular y esteroidogénesis.

Al respecto Gerendai y col. (Gerendai et al., 2002), utilizando marcadores virales transneuronales para el trazado retrogrado de las vías nerviosas permitió identificar los somas neuronales de las vías nerviosas que inervan el ovario, estableciendo que la vía nerviosa parte desde el Sistema Nervioso Central (Núcleo paraventricular del hipotálamo) proyectándose el tronco encefálico y hace su último relevo sináptico en el ganglio celiaco. Se ha demostrado que la inervación simpática en el ovario es noradrenérgica y facilita el efecto de las gonadotropinas en el desarrollo folicular y la esteroidogénesis ovárica de forma aditiva (Aguado et al., 1982, Aguado, 2002, Lara et al., 2002). Las fibras postganglionares que contienen noradrenalina (NA) son la principal aferencia de nervios simpáticos conectados al parénquima del

ovario (Lara et al., 2002), y estos nervios están estrechamente asociados con las células del estroma y de las tecas foliculares, las cuáles expresan receptores beta2 adrenérgicos, cuya activación produce secreción de andrógenos (Lara et al., 2001). Se ha estudiado que la estimulación adrenérgica mediada por isoproterenol sobre los receptores beta presentes en los folículos ováricos, incrementa la producción de AMPc e induce la expresión del receptor de FSH, específicamente en folículos preantrales (Mayerhofer et al., 1997). Por otro lado, los receptores beta-adrenérgicos fluctúan en relación al pico de LH y la ciclicidad estral. Los menores niveles de receptores beta adrenérgicos aparecen en la etapa de estró cuando la liberación de NA es más alta, mientras que los niveles más altos de receptores beta adrenérgicos aparecen durante diestro (Ferruz et al., 1991). Como en todos los órganos, el ovario está sujeto a regulaciones de tipo simpática y parasimpática, a través de inervación autonómica vagal. Las fibras nerviosas parasimpáticas inervan al ovario pero no directamente al folículo ovárico, si no que ingresan por la región hiliar y se asocian a vasos sanguíneos (Gerendai et al., 2002). Sin embargo, existe un control colinérgico folicular, que está asociado a las células de la granulosa (CG) del folículo las cuales producen acetilcolina (ACh), tienen la colina acetiltransferasa (ChAT) que a partir de colina y acetil coenzima A sintetiza ACh, y es almacenada en vesículas a través del transportador vesicular de ACh (vChAT) (Fritz et al., 1999). Finalmente, también se ha descrito que en respuesta a FSH las células de granulosa aumentan la producción de ACh (Mayerhofer et al., 2006). Tanto experimentos in vivo como in vitro muestran que las CG humanas y de rata también expresan receptores de ACh del subtipo muscarínico (MR), M1 y M5 (Mayerhofer and Fritz, 2002, Cruz et al., 2015). La acción de la ACh sobre las CG incrementa la proliferación desorganizando la comunicación de las gap junctions, alteran los

niveles de calcio intracelular y provocan la expresión de factores de transcripción como el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) (Mayerhofer et al., 2003). Finalmente, también se ha caracterizado en CG humanas y en ovario de rata, la enzima que degrada ACh, la acetilcolinesterasa (AChE), la cual hidroliza ACh a colina y acetato (Blohberger et al., 2015, Urra et al., 2016). Resumiendo, el ovario posee una regulación simpática y además un sistema colinérgico local, y ambos participan en la regulación de la función ovárica. Desde el punto de vista fisiopatológico, se ha descrito que la desregulación del sistema simpático es una respuesta causal en la generación de ovario poliquístico en modelos experimentales y en humanos. En estudios en ratas, en las cuales se han producido quistes a través de la administración de estradiol, se ha descrito un aumento en la actividad nerviosa simpática que estaría implicada causalmente en el desarrollo de quistes en el ovario (Espinoza et al., 2018, Barria et al., 1993, Domínguez and Cruz-Morales, 2011). En estos animales con ovarios poliquísticos, existe un aumento de la sensibilidad de los receptores adrenérgicos beta 2 a NE, además de un aumento en los niveles del contenido de NE, los cuales en conjunto producen un aumento en la síntesis y liberación de andrógenos. Esta condición puede ser revertida al desnervar el ovario, disminuyendo los niveles de NE y disminuyendo la respuesta de los receptores beta adrenérgicos al neurotransmisor (Barria et al., 1993). En mujeres con SOP se ha detectado un aumento de las fibras nerviosas que inervan el ovario (Heider et al., 2001) y la actividad del nervio simpático (Sverrisdóttir et al., 2008), lo que implica que un aumento del tono simpático es parte de la patología en humanos.

La etiología del SOP sigue siendo desconocida, sin embargo, es sabido que cursa con diversas alteraciones en el control nervioso que llega al ovario. Gran cantidad



de marcadores de diverso origen neural están alterados en mujeres con SOP, entre ellos marcadores del sistema nervioso simpático y parasimpático (Wojtkiewicz et al., 2014). De hecho, se ha demostrado que mujeres con SOP presentan una activación exacerbada del sistema simpático (Sverrisdóttir et al., 2008) que está acompañada con una mayor cantidad de fibras nerviosas en el ovario (Heider et al., 2001).

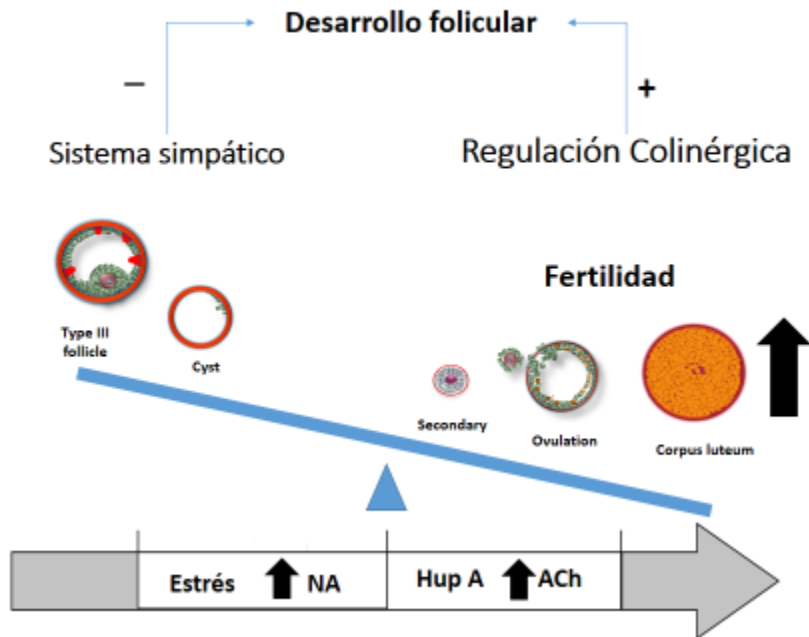
### **Efecto del estrés simpático y de la regulación colinérgica sobre la función ovárica**

La exposición de ratas adultas a estrés por frío produce un aumento de la actividad simpática, aumentando los niveles de NA a nivel periférico sin aumentar los niveles de corticosteroides (Pacak et al., 1998). Este aumento de NA también ocurre en el ovario, donde produce alteraciones en el desarrollo folicular como disminución en los folículos secundarios y la aparición de folículos con hipertecosis, anomalía folicular caracterizada por una teca hipertrofiada (Dorfman et al., 2003). Los folículos con hipertecosis producen una hipersecreción de andrógenos, generando el medio para contribuir a la formación de folículos tipo III (que corresponden a folículos que se encuentran en la transición hacia la formación de quistes), y quistes ováricos. Asimismo, al aumentar el tiempo de exposición de las ratas al modelo de estrés por frío a ocho semanas, se observa que se generan folículos con hipertecosis, folículos tipo III y quistes, lo que implica la formación del fenotipo poliquístico en ovario de rata (Bernuci et al., 2013, Squicciarini et al., 2018).

Por otro lado, la administración local de Huperzina-A (inhibidor potente, selectivo y reversible de la actividad catalítica de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (Wang et al., 2006) en ovario, aumenta el número de los folículos secundarios de menor

tamaño, lo que implica un aumento en el desarrollo folicular inicial. Asimismo, incrementa el crecimiento de los folículos antrales y del ovocito (Du et al., 2018). Por otro lado, aumenta el número de folículos antrales atrésicos y cuerpos lúteos, y disminuye los folículos tipo III (prequísticos), sin encontrarse presencia de quistes, lo que implica un aumento del reclutamiento folicular cíclico y en consecuencia más ovulaciones y que funcionalmente al cruzar los animales con machos fértiles, se traduce en un mayor número de implantaciones en cuernos uterinos y en un mayor número de crías (Urra et al., 2016).

Estos antecedentes en conjunto sugieren un rol del sistema colinérgico local en el desarrollo folicular por lo que se plantea que en condiciones de alteraciones funcionales como las generadas por el estrés por frío, un aumento en los niveles de ACh intraovárica podría favorecer el desarrollo folicular.



**Figura 3.** Hipótesis del balance entre el sistema simpático y el sistema colinérgico sobre el desarrollo folicular. La activación crónica del sistema simpático produce un desbalance en la función ovárica que produce un fenotipo poliquístico en rata. Por otro lado, la modulación farmacológica del sistema colinérgico incrementa la fertilidad, por lo que podría detener las alteraciones en la función ovárica inducidas por estrés.

## **HIPÓTESIS**

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

“La administración intraovárica del inhibidor enzimático de la acetilcolinesterasa Huperzina-A revierte las alteraciones en la función ovárica inducidas por estrés por frío en ratas adultas”.

## **OBJETIVO GENERAL**

Como objetivo general de esta tesis planteamos lo siguiente:

“Determinar el efecto de Huperzina-A sobre los niveles de ACh, la función ovárica y la fertilidad de ratas adultas sometidas a estrés por frío”.

## **OBJETIVO ESPECÍFICO N°1**

Determinar si el efecto del estrés por frío de 4 semanas induce cambios en los niveles de ACh, la actividad AChE y la función ovárica en ratas hembra. Para ello se analizará:

- El impacto del estrés por frío de 4 semanas sobre el contenido ovárico de NA, ACh y la actividad de la ACHE ovárica.
- El impacto del estrés por frío de 4 semanas sobre el desarrollo folicular.
- El impacto del estrés por frío de 4 semanas sobre los niveles de hormonas esteroidales plasmáticas T, E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>.

## **OBJETIVO ESPECIFICO N°2**

Determinar si el tratamiento intraovárico con Huperzina-A favorece el desarrollo folicular y la función ovárica en ratas hembra sometidas a estrés por frío. Para ello se analizará:

- El impacto de los efectos producidos por la administración intraovárica de Huperzina-A sobre los niveles de NA, ACh y la actividad de la AChE en ratas que fueron sometidas a estrés por frío de cuatro semanas.
- El impacto de los efectos producidos por la administración intraovárica de Huperzina-A sobre el desarrollo folicular de ratas sometidas a estrés por frío de cuatro semanas.
- El impacto de los efectos producidos por la administración intraovárica de Huperzina-A sobre los niveles de hormonas esteroidales plasmáticas T, E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>, en ratas sometidas a estrés por frío de cuatro semanas.
- El impacto de los efectos producidos por la administración intraovárica de Huperzina-A sobre la ciclicidad estral, en ratas sometidas a estrés por frío de cuatro semanas.

### **OBJETIVO ESPECÍFICO N°3**

Determinar si el tratamiento intraovárico con Huperzina-A aumenta la fertilidad de ratas hembra sometidas a estrés por frío. Para ello se analizará:

- El impacto de los efectos producidos por la administración intraovárica de Huperzina-A sobre la tasa de fertilidad, en ratas sometidas a estrés por frío de cuatro semanas.
- El impacto de los efectos producidos por la administración intraovárica de Huperzina-A sobre los puntos de implantación, el número de crías y la razón entre crías machos y hembras, en ratas sometidas a estrés por frío de cuatro semanas.

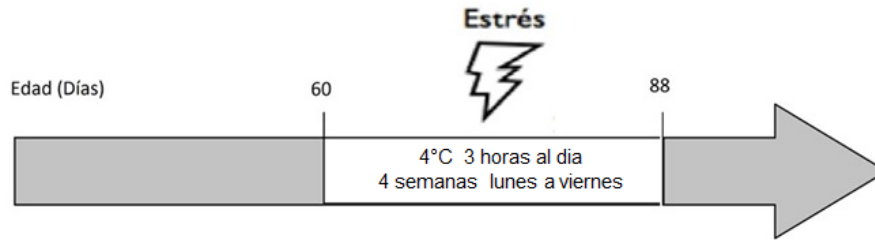
## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Animales**

Se utilizaron ratas hembras adultas Sprague-Dawley aproximadamente de 250g de peso y 2 meses de edad (edad fértil). Se mantuvieron en jaulas individuales a 23°C bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 horas y con la disposición de agua y alimento *ad libitum*. Todos los procedimientos fueron autorizados previamente por el comité de ética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile (Protocolo: CBE2016-13) y los experimentos fueron ejecutados de acuerdo a la “Guía Para El Cuidado y Uso De Animales De Laboratorio” de la *National Academy of Sciences*.

### **Modelo de estrés Objetivo 1**

Se utilizó la metodología de Dorfman (Dorfman et al., 2003). Este modelo de estrés produce una hiperactivación de los nervios simpáticos que inervan el ovario, produciendo un aumento en los niveles de NA. Esta activación simpática mediada por frío no produce una activación significativa de las vías de estrés mediadas por glucocorticoides (Pacak et al., 1998). Los animales fueron transportados en sus jaulas a una pieza a 4°C y se fueron dejados ahí por 3 horas diariamente, de lunes a viernes por cuatro semanas.

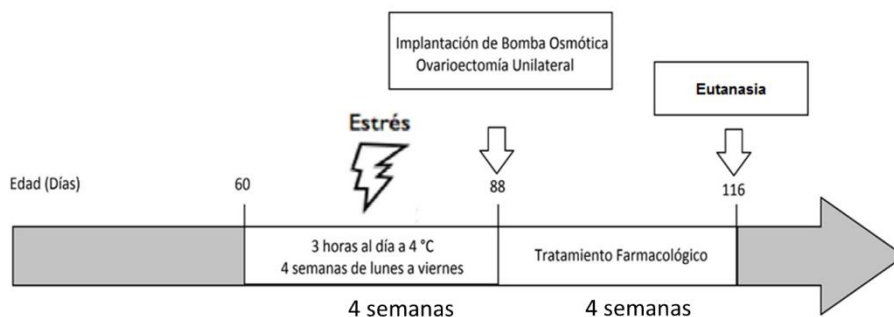


**Figura 4.** Esquema de protocolo de estrés por frío de 4 semanas. Las ratas Sprague Dawley de 60 días son llevadas a un cuarto a 4°C por 3 horas a día, de lunes a viernes por 4 semanas. Al final del periodo de estrés los animales se eutanasia para recolectar suero y tejidos.

### Modelo de estrés Objetivo2

Se utilizó la metodología de Bernuci (Bernuci et al., 2013). Este modelo de estrés produce una hiperactivación de los nervios simpáticos que inervan el ovario, y la activación por 4 semanas, produce fenotipo de ovario poliquístico en la rata 4 semanas posterior al estrés. Los animales fueron transportados en sus jaulas a una pieza a 4°C y se fueron dejados ahí por 3 horas diariamente, de lunes a viernes por cuatro semanas. Al termino de las cuatro semanas se realiza una ovariectomía unilateral (OVX), extrayéndose el ovario derecho. En el ovario restante se instaló una minibomba osmótica ALZET 2004 (0,25µL/hr/ volumen de 200 µL) por cuatro semanas según el protocolo descrito por Urra et al.(Urra et al., 2016). Se administraron los fármacos Huperzina-A (10uM) y Atropina (10uM), considerando el peso del ovario en la edad adulta, el cual es alrededor de los 40 mg (fig. 16) y se preparó un volumen de 200 µL. El grupo Sham corresponde a las ratas en las cuales se realizó OVX, pero no se instaló la minibomba osmótica solo la cánula.





**Figura 5.** Esquema de protocolo de estrés por frío, ovariectomía e implantación de minibomba osmótica. Las ratas Sprague Dawley de 60 días son llevadas a un cuarto a 4°C por 3 horas a día, de lunes a viernes por 4 semanas. Posteriormente se administra fármaco por 28 días mediante una mini-bomba osmótica. Al final del tratamiento los animales son sometido a eutanasia para recolectar suero y tejidos.

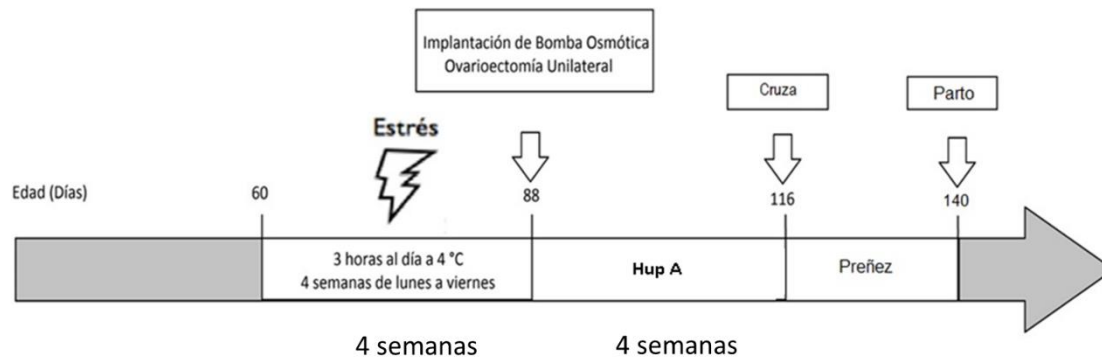
Las ratas fueron anestesiadas con una solución de ketamina/xilazina (60 mg/kg de peso de ketamina; 10mg/Kg de peso de xilazina), donde el volumen a inyectar está en el rango de 200 a 600µL, dependiendo del peso del animal (de aproximadamente 250g), y las minibombas osmóticas fueron implantadas en la región dorsal y cargadas con solución en los grupos de estudio descritos en la siguiente tabla:

| Grupo | Condición | Tratamiento                            | Nomenclatura           |
|-------|-----------|--|------------------------|
| 1     | Control   | Sham                                   | Control-Sham           |
| 2     | Estrés    | Sham                                   | Estrés-Sham            |
| 3     | Estrés    | Huperzina-A (10 µM)                    | Estrés-Hup-A           |
| 4     | Estrés    | Huperzina-A (10 µM) + Atropina (10 µM) | Estrés-Hup-A -Atropina |

### Modelo Experimental

Se utilizó la metodología de Bernuci (Bernuci et al., 2013) modificada (fig. 26). Este modelo de estrés produce una hiperactivación de los nervios simpáticos que inervan el ovario, y la activación por 4 semanas, produce fenotipo de ovario poliquístico en la rata 4 semanas posterior al estrés. Los animales fueron transportados en sus jaulas a una pieza a 4°C y se fueron dejados ahí por 3 horas

diariamente, de lunes a viernes por cuatro semanas. Al término de las cuatro semanas se realiza una ovariectomía unilateral (OVX), extrayéndose el ovario derecho. En el ovario restante se instaló una minibomba osmótica ALZET 2004 (0,25µL/hr/ volumen de 200 µL) por cuatro semanas según el protocolo descrito por Urra et al.(Urra et al., 2016). Se administraron los fármacos Huperzina-A (10uM) y Atropina (10uM). El grupo Sham corresponde a las ratas en las cuales se realizó OVX, pero no se instaló la minibomba osmótica solo la cánula. Posterior al periodo se espera el primer proestro para cruzar las ratas con ratas macho de fertilidad probada. Se analizan frotis para encontrar espermios y se esperan 21 días para el parto. Luego del parto, se esperan 4 días para contar el número de crías, y el sexo, además de sacrificar a la rata madre y contar los implantes en cuernos uterinos. Durante todo el periodo se siguió la ciclicidad estral (fig. 27).



**Figura 6.** Protocolo de experimentos de Fertilidad. Las ratas Sprague Dawley de 60 días son llevadas a un cuarto a 4°C por 3 horas a día, de lunes a viernes por 4 semanas. Posteriormente se administra fármaco por 28 días mediante una minibomba osmótica. Al final del tratamiento los animales se cruzan con machos de fertilidad probada para preñarlas y esperar el nacimiento de crías post 21 días de gestación.

### Determinación del ciclo estral

En ambas series experimentales con el fin de estimar variaciones en el ciclo reproductivo se registró el ciclo estral por frotis vaginal seguido de examen por

microscopía óptica. El ciclo estral de la rata dura 4 días y se divide en 4 etapas: estro (E), diestro y metaestro (que se cuantificaron como una misma etapa) (D) y proestro (P). Cada día se registró la etapa del ciclo en la cual se encontraban los animales y al final del tratamiento se graficaron los resultados. Junto con los ciclos normales de 4 días, se consideraron también ciclos de duraciones mayores 5 días que se evaluaron según las siguientes figuras:



**Figura 7.** Esquema de ciclos estrales de 4 y 5 días.

Los ciclos de cinco días se producen por la disyunción entre el pico de LH (en conjunto con el aumento de FSH) en la noche del proestro y la población de células presentes en el frotis. Las ratas con ciclos de 5 días se caracterizan por dos días consecutivos de cornificación de las células en el frotis vaginal, por lo que en este caso la ovulación ocurriría en las primeras horas de la mañana del segundo día (Goldman et al., 2007).

### **Cuantificación de los niveles intraováricos de ACh y actividad AChE**

La cuantificación de los niveles de ACh se realizó utilizando la metodología publicada previamente (Urra et al., 2016). El ovario se homogeneizó en diez volúmenes de PBS en hielo. La determinación de ACh se realizó en el homogeneizado por uso del kit Amplex® Acetylcholine/ Acetylcholinesterase Assay

kit (INVITROGEN, Eugene (OR), USA), siguiendo las instrucciones recomendadas por el proveedor. Brevemente, la ACh es hidrolizada por AChE a colina. La colina formada se oxida entonces por la colina oxidasa, y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado como resultado de esta reacción, interactúa con el reactivo Amplex Red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina) en presencia de peroxidasa de rábano picante para formar el compuesto altamente fluorescente Resorufina. Los resultados se expresan por Cantidad total de ACh en  $\mu\text{mol}$  por ovario. El valor mínimo detectable para AChE fue 0,002 U / mL y para ACh fue 0,3  $\mu\text{M}$ , rango de 0,3  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  (Invitrogen, Eugene (OR), EE. UU.).

### **Cuantificación de los niveles intraováricos de NA**

La cuantificación de los niveles de NA se realizó utilizando metodología publicada anteriormente (Del Campo et al., 2019). El ovario se homogenizó en frío en diez volúmenes de ácido perclórico 0,2 N. El homogeneizado se centrifugó a 10000 g durante 10 min y el sobrenadante fue utilizado para determinar NA. Se llevó a cabo la cuantificación de los niveles de NA con el kit Mouse / Rat Noradrenaline (Norepinephrine) ELISA kit - Research® (IMMUSMOL, Pessac, France). El valor mínimo detectable es 1,3 pg / mL, rango 0,2–32 ng / mL. Brevemente, la NA se extrajo utilizando un Gel de afinidad específico para cis-diol, fueron acilados y luego derivatizados enzimáticamente. Los estándares derivatizados, los controles y las muestras, así como el analito unido a la fase sólida, compiten por un número fijo de sitios de unión de antisuero. El anticuerpo unido a la fase sólida se detectó utilizando una IgG anti-conejo conjugada con peroxidasa y TMB como sustrato. La reacción se midió a 450 nm. Los resultados se expresan por la cantidad total de NA en ng por ovario. La sensibilidad fue de 2 pg / ml, y la variabilidad intra e inter-

ensayo fue de 8,4 y 8,0%, respectivamente. La reactividad cruzada encontrada fue de 0,14% para adrenalina y 1,8% para dopamina.

### **RT-PCR Cuantitativo**

El análisis de PCR utilizó ADNc sintetizado a partir del ARN extraído de las muestras con un kit comercial. Luego de la extracción de ARN, 5 µg de cada una de las muestras se sometieron a la reacción de transcripción reversa para obtener ADNc. La reacción se llevó a cabo a 42°C por 60 min usando 1,6 mM dNTPs, 10 mM DTT, 176 nM partidores randomizados (Invitrogen, Carlsbad, CA), 25 U RNasaOUT (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 125 U de transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA). La reacción se detuvo por calentamiento de las muestras a 75°C por 10 min. Posteriormente los ADNc obtenidos se amplificaron mediante la PCR en tiempo real, en presencia de partidores específicos para cada uno de genes de interés. Para cuantificar el ARNm de AChE, todas las muestras fueron analizadas en triplicado, utilizando para cada una de ellas un volumen de reacción de 20 µL: 12,5 µL de 2X Brilliant®Platinum SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene®, 1834 State Hwy. 71 West) + 7,2 µL de agua estéril nanopura + 0,4 µL de cada uno de los partidores y 2 µL de ADNc. Después de iniciada la activación de la polimerasa a 95°C por 10 min se realizó un protocolo de amplificación estándar de 40 ciclos en el termociclador MJ Research PCR tiempo real (MJ Research, modelo PT-200, Inc., Watertown, MA). Las condiciones de cada ciclo de reacción para cada gen fueron las siguientes:

| Gen   |              | Alineación    | Elongación   | Cuantificación |
|-------|--------------|---------------|--------------|----------------|
| GAPDH | 95°C x20 seg | 60°C x 15 seg | 72°C x20 seg | 74°C x0,06seg  |
| AChE  | 95°C x20 seg | 60°C x 15 seg | 72°C x20 seg | 74°C x0,06seg  |

La intensidad de fluorescencia de la doble hebra específica SYBR-Green I, muestra la cantidad realmente formada del producto de PCR y que es leída al final de cada paso de la elongación. Para determinar la especificidad del producto formado se realizó una “curva de melting” entre 72-85°C bajo medición continua de fluorescencia, donde cada uno de los productos PCR amplificados tuvo una única temperatura de desapareamiento (melting point). La cantidad de ARNm inicial de cada gen de interés fue calculada determinando el ciclo en el cual comenzó el aumento lineal del producto de PCR. Este valor de ciclo se interpoló en una curva estándar obtenida por diluciones seriadas de una muestra de concentración conocida. Los partidores fueron diseñados a partir de las secuencias publicadas en el Genbank:

| Partidor | sentido              | antisentido          | T °C | N° Acceso   |
|----------|----------------------|----------------------|------|-------------|
| GAPDH    | TCAAGAACGAAGTCGGAGG  | GGACATCTAAGGGCATCACA | 60   | NR_046237.1 |
| AChE     | CCCATGGCTATGAAATCGAG | TCAGGCTCACGTATTGCTC  | 60   | NM_172009.1 |

### **Morfometría**

Para el procedimiento histológico se realizó la extracción del ovario e inmediatamente se fijó con “Bouin alcohólico” durante 24h, posteriormente se colocó en etanol 70% por al menos 24h, para luego ser incluido en parafina. Se realizaron cortes seriados y consecutivos con un espesor de 6µm a los que se les aplicó una tinción de Hematoxilina-Eosina. Para el recuento morfológico se utilizaron criterios publicados anteriormente (Barra et al., 2014) y se analizaron las poblaciones de folículos secundarios, antrales sanos, antrales atrésicos, cuerpos lúteos y quistes. Los folículos secundarios son aquellos que no presentan una cavidad antral, pero sí dos o más capas de células de la granulosa; folículos

antrales atrésicos presentan más del 5% de células con núcleo picnótico en la sección más larga; folículos antrales sanos son esos donde el núcleo del ovocito podrá ser visualizado. Los quistes foliculares son aquellos que carecen de ovocito y han desarrollado una larga cavidad antral, con una teca bien definida y una delgada monocapa de células de granulosa (en algunos casos)(Lara et al., 2000).

### **Determinación de testosterona, estradiol y progesterona por Enzimo inmuno ensayo (EIA)**

Los niveles plasmáticos de T, E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> fueron medidos utilizando la metodología publicada anteriormente (Squicciarini et al., 2018). Los niveles plasmáticos de T, E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> fueron determinados por EIA, siguiendo las instrucciones del proveedor. El número de catálogo de los kits fueron 11-TESHU-E01, 11-ESTHU-E01 and 11-PROHU-E01 para T, E<sub>2</sub> and P<sub>4</sub>, respectivamente (Alpco Diagnostic, Windham, NH, USA). Las variaciones intra e inter-ensayo fueron menos del 5% para E<sub>2</sub>, menos del 6% para T y menos del 5% para P<sub>4</sub>. Los valores mínimos detectables fueron 10 ng / ml, 0,02 ng / ml y 0,1 ng / ml, para T, E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> respectivamente. (Alpco Diagnostic, Windham, NH, EE. UU.).

### **Cuantificación de proteínas y ensayos de Western blot**

Los ovarios extraídos fueron homogenizados en 10 volúmenes de buffer de lisis RIPA (1% de NP40, 0,5% de desoxicolato de sodio, 0,1% de SDS en PBS; justo antes de usar se agrega 10 µl de la siguiente mezcla (10 mg / ml de solución madre de PMSF; aprotinina y ortovanadato de sodio) en presencia del Mini cóctel inhibidor de proteasa sin EDTA completo (Roche, Basilea, Suiza). Las proteínas extraídas se cuantificaron con el método de Lowry (LOWRY et al., 1951) y se agregaron 50

µg de proteína en un gel de poliacrilamida al 10%. Las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa y fueron bloqueadas con leche al 5% y se incubaron con un anticuerpo que reconoce todas las isoformas de AChE ab183591 de Abcam RabMAb. Finalmente, las bandas marcadas con anticuerpo fueron detectadas y cuantificadas usando densitometría.

Como control positivo se utilizó un extracto total de cerebro de rata y el control negativo se realizó con el anticuerpo preadsorbido con el péptido inmunogénico (1 µL de anticuerpo es preadsorbido con 10 µL de péptido) ab45700 de Abcam.

### **Evaluación de la Fertilidad**

Se evaluaron todos los grupos de ratas del protocolo experimental y se determinó la tasa de fertilidad en porcentaje, entre las ratas que no quedaron preñadas y las ratas que quedaron preñadas y tuvieron crías nacidas vivas.

### **Análisis Estadístico**

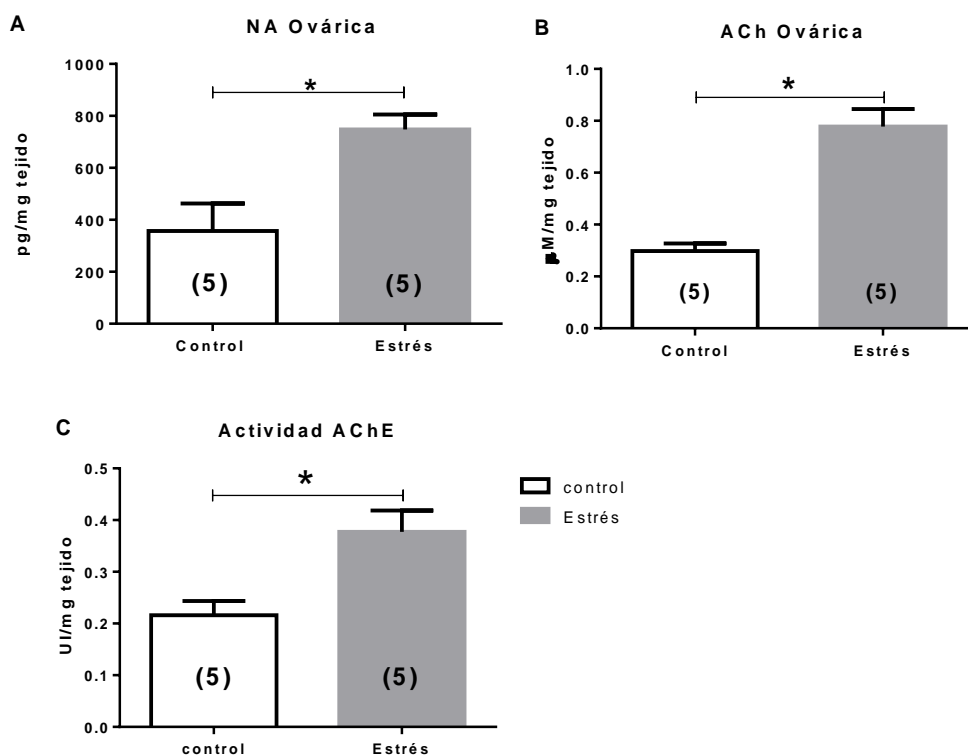
Se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para verificar la distribución normal de los datos. En el caso de que los datos no evidenciaran distribución normal, Las diferencias entre los grupos control y estrés se analizaron con Mann Whitney no pareado para los experimentos in vivo. Cuando se analizaron cuatro grupos, utilizamos Kruskal- Wallis de una vía con la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Por otro lado, para comparar diferencias porcentuales entre grupos se utilizó la prueba Chi cuadrado. La significancia se estableció en  $P < 0.05$ . El número mínimo de ratas que se utilizaron para los experimentos se calculó como se describe en Zar et al. (Zar, 1984). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).



## RESULTADOS

### Determinación de NA, ACh y actividad AChE en ratas sometidas a 4 semanas de estrés

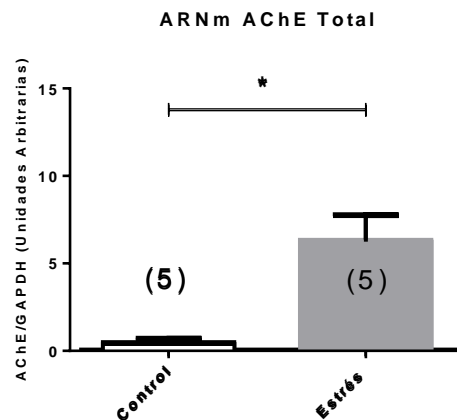
La figura 8 muestra los niveles de NA, ACh y la actividad AChE en tejido ovárico posterior a 4 semanas de estrés. Los niveles de NA se encuentran aumentados (fig. 8A), los niveles de ACh también se encuentran aumentados (fig. 8B), al igual que existe un aumento de la actividad de la AChE (fig. 8C).



**Figura 8.** Efecto de la exposición a estrés por frío de 4 semanas en el contenido ovárico de Noradrenalina (A), Acetilcolina (B) y en la actividad de la acetilcolinesterasa (C). Resultados están expresados como pg/mg de tejido (A, B) y Unidades Internacionales (UI)/mg de tejido (C) que representan la media  $\pm$  SEM (n=5 por hembra control y estrés). \*P<0.05

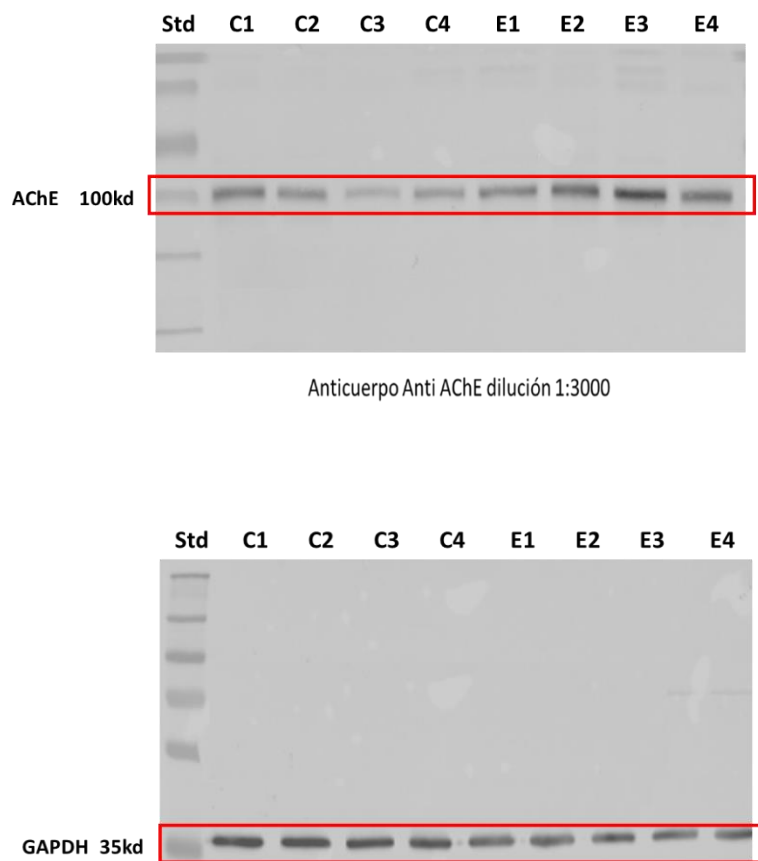
## Determinación de niveles de ARNm y niveles proteicos de AChE en ratas sometidas a estrés

En la figura 9 se muestran los niveles de ARNm de AChE normalizados por el gen constitutivo GAPDH. Se observa un aumento de los niveles al final de las 4 semanas de estrés.

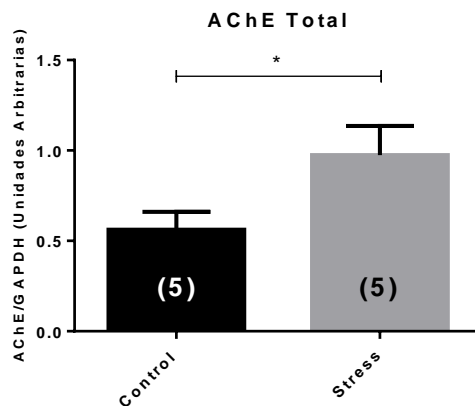


**Figura 9.** Efecto de la exposición a estrés por frío de 4 semanas sobre los niveles de ARNm de AChE total en ovario de rata. Los resultados están expresados en Unidades Arbitrarias que representan la media  $\pm$  SEM (n=5 por hembra control y estrés). \*P<0.05

En la figura 10 se muestran las membranas de nitrocelulosa representativas de la técnica western blot. La marca para AChE se muestra a un peso de 100 Kd (membrana derecha) y para GAPDH a un peso de 35 Kd (membrana izquierda). En la figura 11 se muestra la cuantificación de las bandas de las ratas del grupo control y estrés normalizadas por el gen constitutivo GAPDH. Los niveles proteicos de AChE se encuentran aumentados (fig. 11).



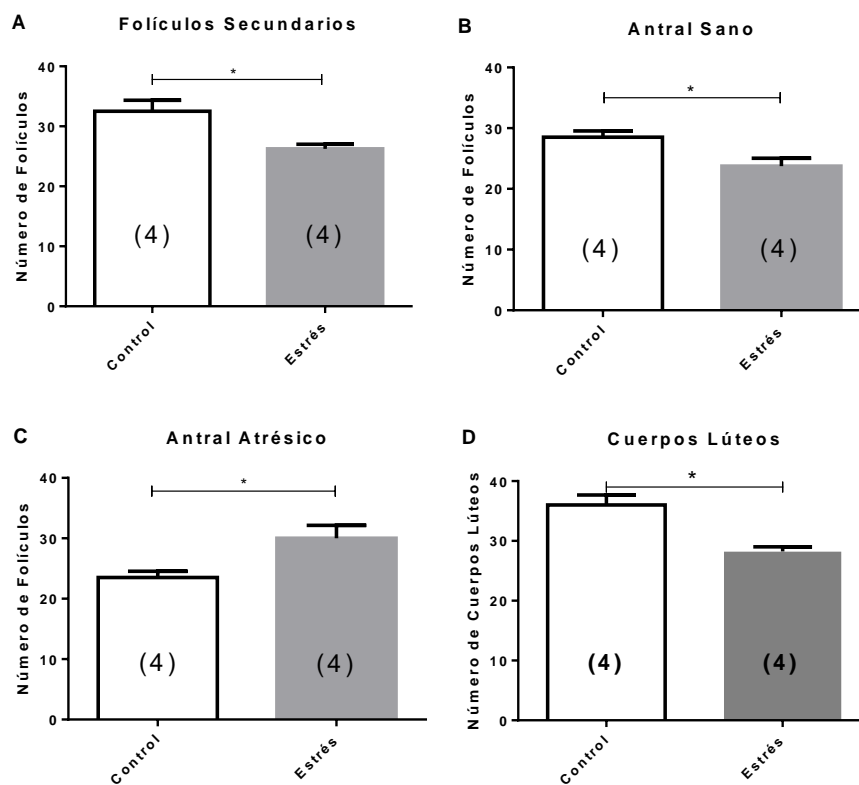
**Figura 10.** Efecto de la exposición a estrés por frío de 4 semanas sobre los niveles proteicos de AChE total de ovario de rata. Imagenes representativas de una membrana de nitrocelulosa donde se muestran las bandas encontradas a los 100 kd para AChE y 35 kd para GAPDH (C = control, E = estrés, Std= estándar de peso molecular)



**Figura 11.** Efecto de la exposición a estrés por frío de 4 semanas sobre los niveles proteicos de AChE total de ovario de rata. Los resultados están expresados en Unidades Arbitrarias que representan la media  $\pm$  SEM ( $n=5$  por hembra control y estrés). \* $P<0.05$

## Determinación del desarrollo folicular en ratas sometidas a estrés

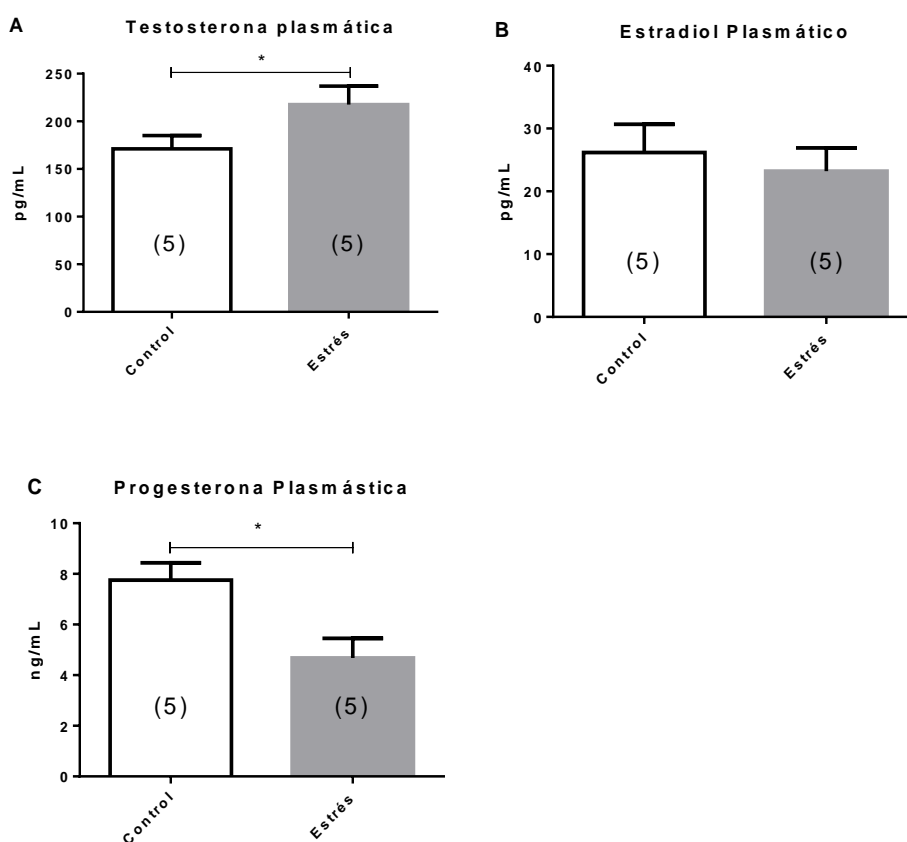
La figura 12 muestra el efecto del estrés de 4 semanas sobre el desarrollo folicular. El estrés disminuye el número de folículos secundarios (fig. 12A), disminuye el número de folículos antrales sanos (fig.12B), aumenta el número de folículos antrales atrésicos (fig. 12C) y disminuye el número de cuerpos lúteos (fig. 12D).



**Figura 12.** Efecto de la exposición a estrés por frío de 4 semanas en el número de Folículos Secundarios (A), Folículos Antrales Sanos (B) y Atrésicos (C) y Cuerpos lúteos (D) de ratas adultas. Resultados representan la media  $\pm$  SEM (n=4). \*P<0.05.

## Determinación de los niveles de hormonas esteroidales en ratas sometidas a estrés

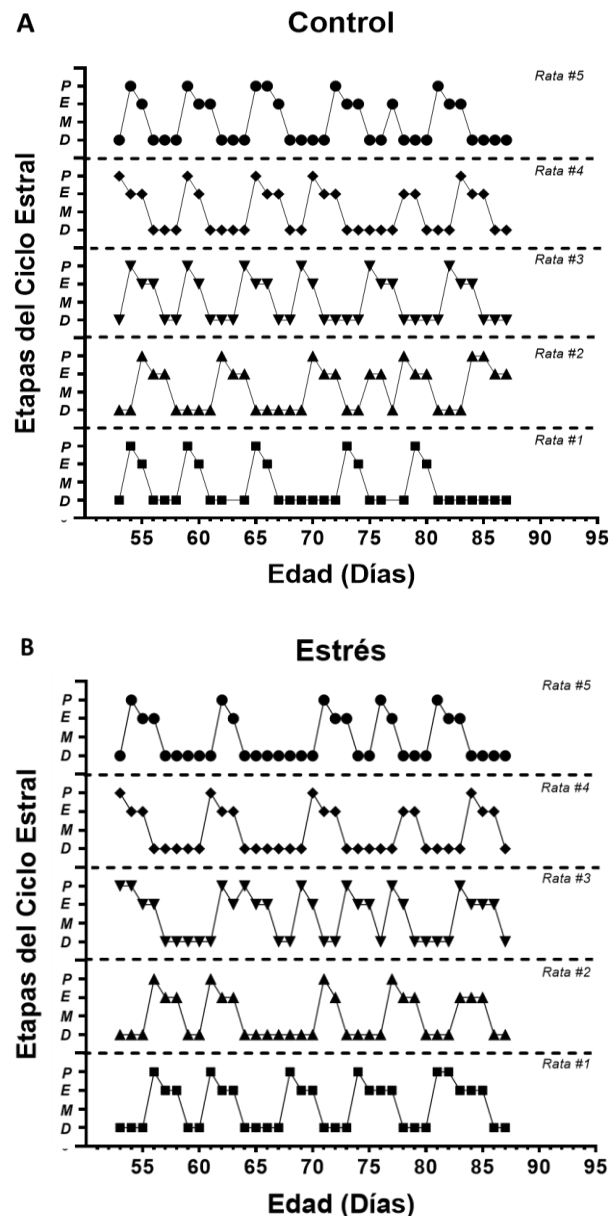
La figura 13 muestra los niveles de T, E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> en ratas sometidas a estrés. El estrés aumenta los niveles de T (fig. 13A), no produce cambios en E<sub>2</sub> (fig. 13B) y disminuye los niveles de P<sub>4</sub> (fig. 13 C).



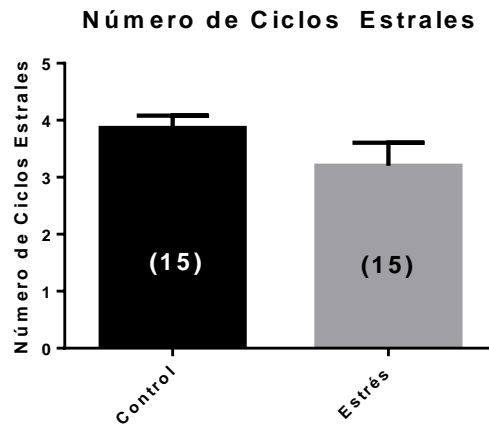
**Figura 13.** Efecto de la exposición a estrés por frío de 4 semanas en los niveles plasmáticos de Testosterona(A), Estradiol (B) y Progesterona (C) de ratas hembras adultas. Resultados representan la media  $\pm$  SEM (n=5). \*P<0.05

## Ciclicidad estral de ratas sometidas a estrés

La figura 14 muestra los ciclos de ratas de los grupos control y estrés. Estos ciclos fueron cuantificados y no se encontró diferencias en el número de ciclos (fig. 15).



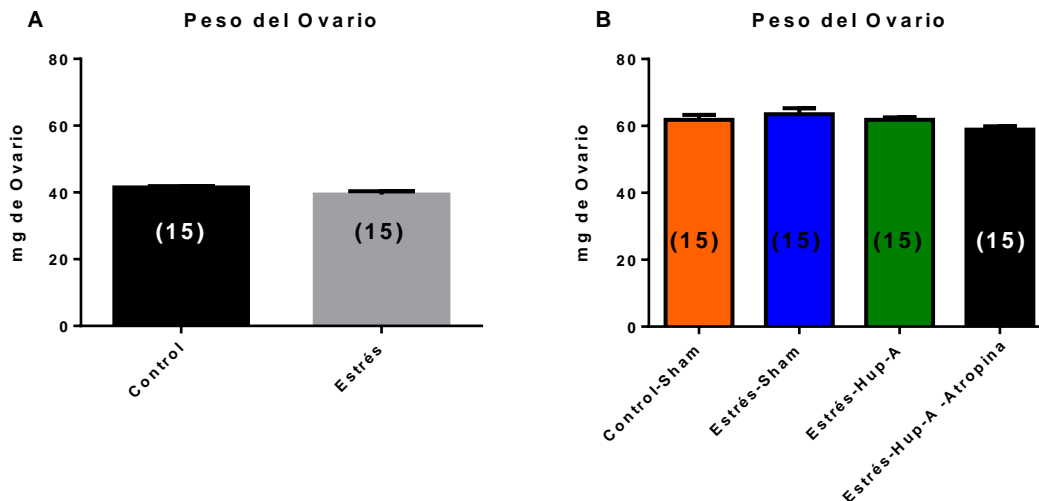
**Figura 14.** Gráficos representativos de los ciclos estrales de ratas control (A) y Estrés de 4 semanas (B). Los puntos representan las diferentes etapas del ciclo estral: Diestro (D), Proestro (P) y Estro (E). El paso P-E-D representa un ciclo estral correspondiente a una ovulación.



**Figura 15.** Número de ciclos estrales contados durante el periodo de 28 días de estrés en ratas adultas. Se cuantificaron los pasos P-E-D para determinar cada ciclo. Resultados representan la media  $\pm$  SEM (n=15).

### Efecto de la ovariectomía unilateral en el peso del ovario

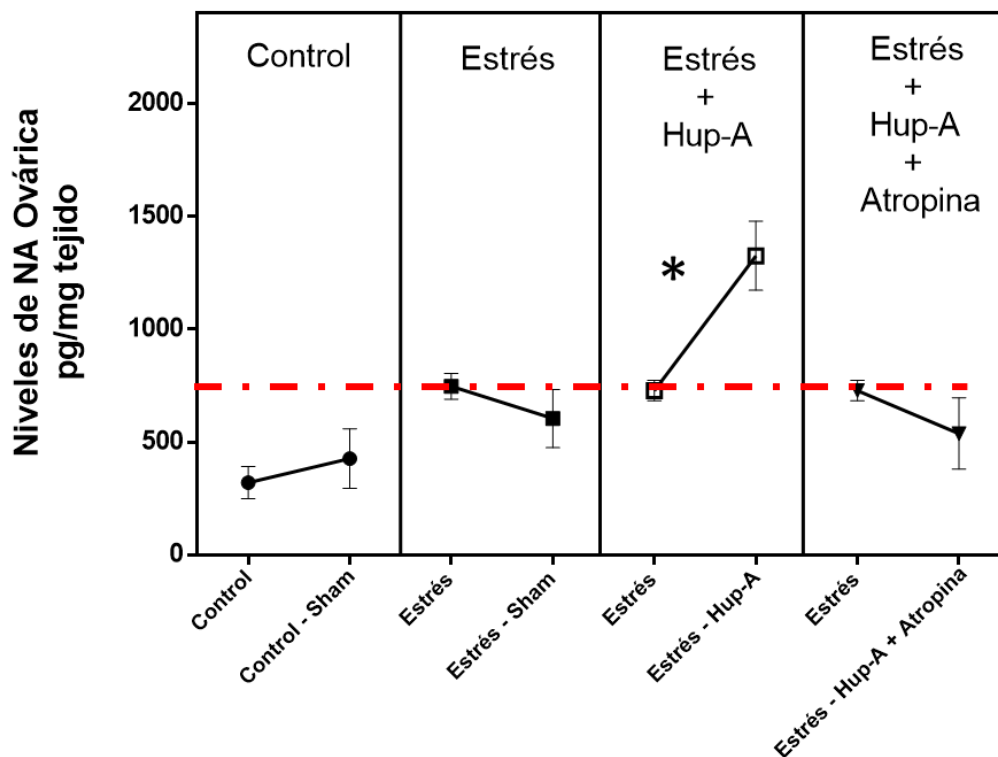
La figura 16 describe los cambios en el peso del ovario por efecto del estrés y los cambios producidos por la ovariectomía unilateral posterior al periodo de estrés. Se observa un incremento de peso posterior a la ovariectomía en todos los grupos.



**Figura 16.** Peso del ovario al final del periodo de estrés (A) y peso del ovario posterior a ovariectomía unilateral. Los grupos corresponden a Control-Sham (Naranja), Estrés-Sham (Azul), Estrés-Hup-A (Verde) y Estrés-Hup-A – Atropina (Negro). Resultados representan la media  $\pm$  SEM (n=15).

## Determinación de NA, ACh y actividad AChE en ratas tratadas con Hup-A posterior a estrés

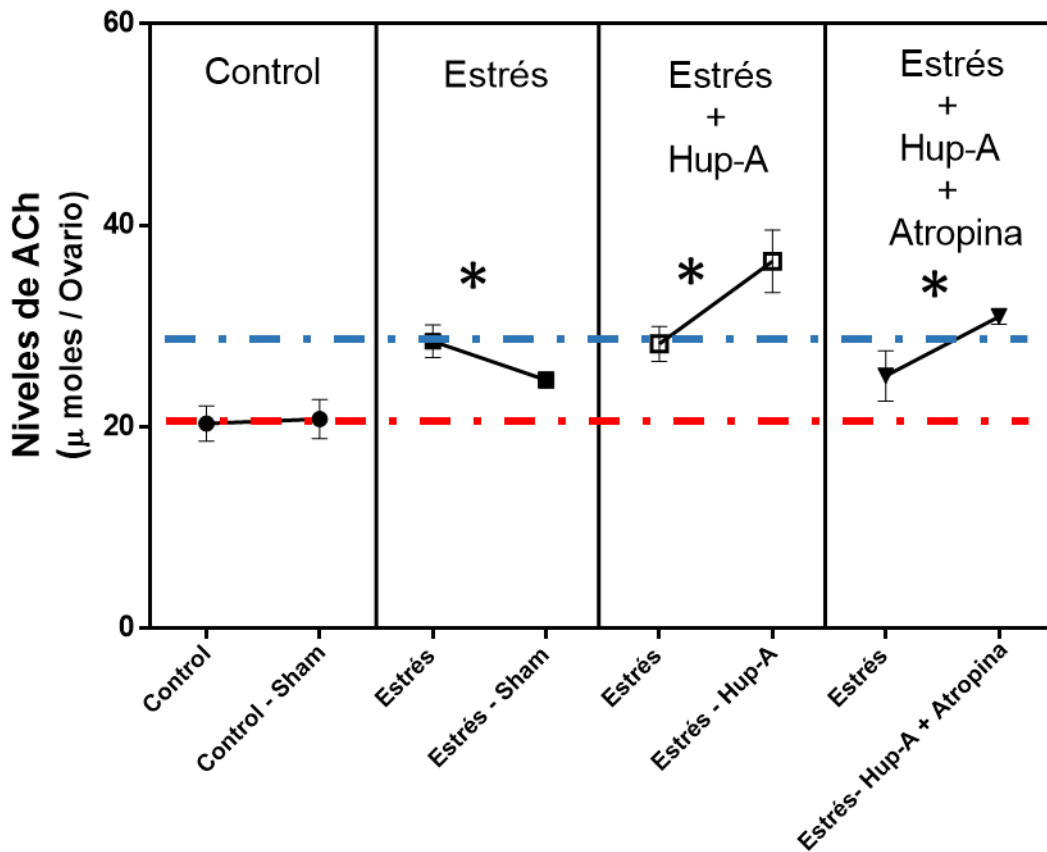
La figura 17 describe los cambios en los niveles de NA ovárica al final del periodo de estrés comparado con las cuatro semanas posterior al término del estrés en los diferentes grupos experimentales. En el grupo Control-Sham y Estrés-Sham no se observan cambios en los niveles de NA (fig. 17). En el grupo Estrés -Hup-A se observa un aumento en los niveles de NA y en el grupo Estrés-Hup-A -Atropina no se observan cambios (fig.16).



**Figura 17.** Efecto temporal del estrés y el tratamiento farmacológico con Huperzina-A sobre el contenido de NA ovárica. Los grupos corresponden a Control-Sham, Estrés-Sham, Estrés- Hup-A y Estrés- Hup-A – Atropina. Resultados expresados en pg/mg de tejido representan la media  $\pm$  SEM ( $n=5$  animales por grupo). \* $P<0.05$

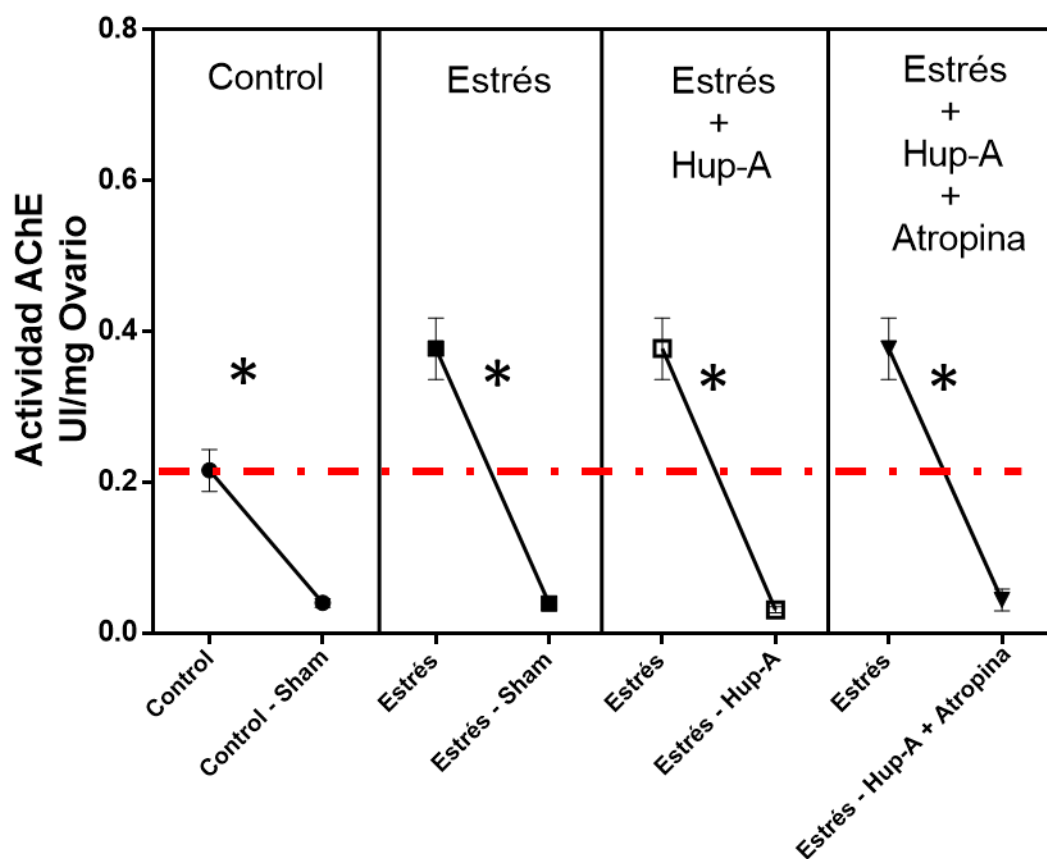


La figura 18 describe los cambios en los niveles de ACh al final del periodo de estrés comparado con las cuatro semanas posterior al término del estrés en los diferentes grupos experimentales. En el grupo Control-Sham no se observan cambios en los niveles de ACh, mientras que en el grupo Estrés-Sham se observa una disminución (fig. 18). En el grupo Estrés-Hup-A y en el grupo Estrés-Hup-A -Atropina se observa un aumento en los niveles de ACh (fig. 18).



**Figura 18.** Efecto temporal del estrés y el tratamiento farmacológico con Huperzina-A sobre el contenido de ACh ovárica. Los grupos corresponden a Control-Sham, Estrés-Sham, Estrés- Hup-A y Estrés- Hup-A – Atropina. Resultados expresados en  $\mu\text{M}$  representan la media  $\pm$  SEM ( $n=5$  animales por grupo). \* $P<0.05$

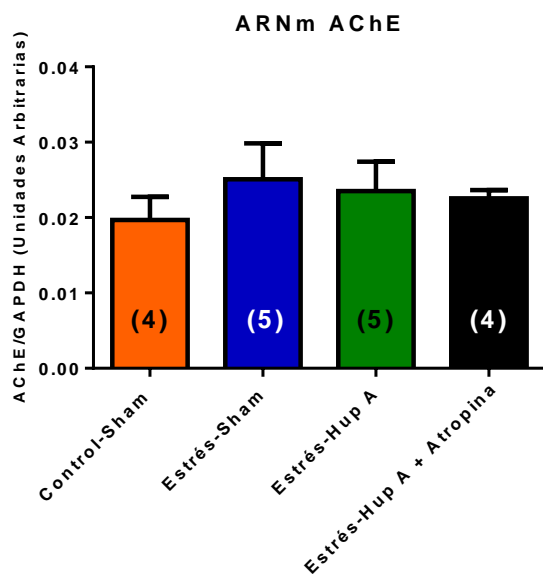
La figura 19 muestra la actividad de la AChE en ovario al final del periodo de estrés comparado con las cuatro semanas posterior al término del estrés en los diferentes grupos experimentales. Se observa una disminución de la actividad AChE en todos los grupos experimentales (fig.19).



**Figura 19.** Efecto temporal del estrés y el tratamiento farmacológico con Huperzina-A sobre la actividad de la AChE. Los grupos corresponden a Control-Sham, Estrés-Sham, Estrés- Hup-A y Estrés- Hup-A – Atropina. Resultados expresados en UI/mg de ovario representan la media  $\pm$  SEM (n=5 animales por grupo). \*P<0.05

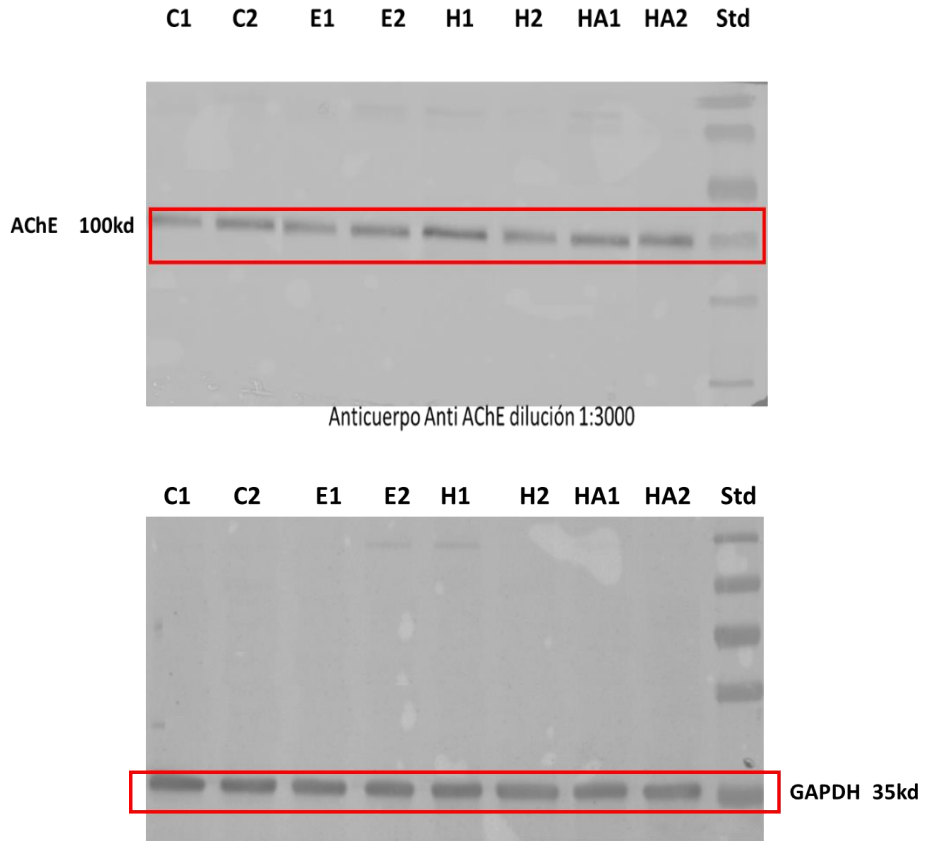
## Determinación de niveles de ARNm y niveles proteicos de AChE en ratas tratadas con Hup-A posterior a estrés

En la figura 20 se muestran los niveles de ARNm de AChE normalizados por el gen constitutivo GAPDH. No se observan cambios en los diferentes grupos experimentales.

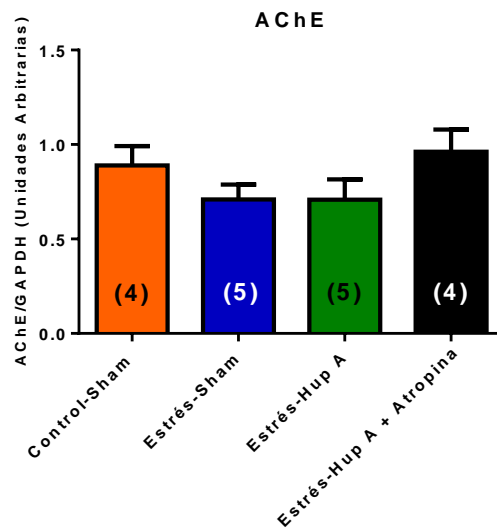


**Figura 20.** Efecto de la exposición a estrés por frío de 4 semanas y tratamiento farmacológico sobre los niveles de ARNm de AChE. Los grupos corresponden a Control-Sham (Naranja), Estrés-Sham (Azul), Estrés-Hup-A (Verde) y Estrés-Hup-A – Atropina (Negro). Resultados expresados como unidades arbitrarias expresadas como media  $\pm$  SEM ( $n=4$  Control-Sham,  $n=5$  Estrés-Sham,  $n=5$  Estrés Hup-A y  $n=4$  Estrés-Hup-A – Atropina).

En la figura 21 se muestran las membranas de nitrocelulosa representativas de la técnica western blot. La marca para AChE se muestra a un peso de 100 Kd (membrana derecha) y para GAPDH a un peso de 35 Kd (membrana izquierda). En la figura 11 se muestra la cuantificación de las bandas de las ratas del grupo Control-Sham, Estrés-Sham, Estrés-Hup-A y Estrés-Hup-A -Atropina, normalizadas por el gen constitutivo GAPDH. No hay cambios en los niveles proteicos de AChE (fig. 22).



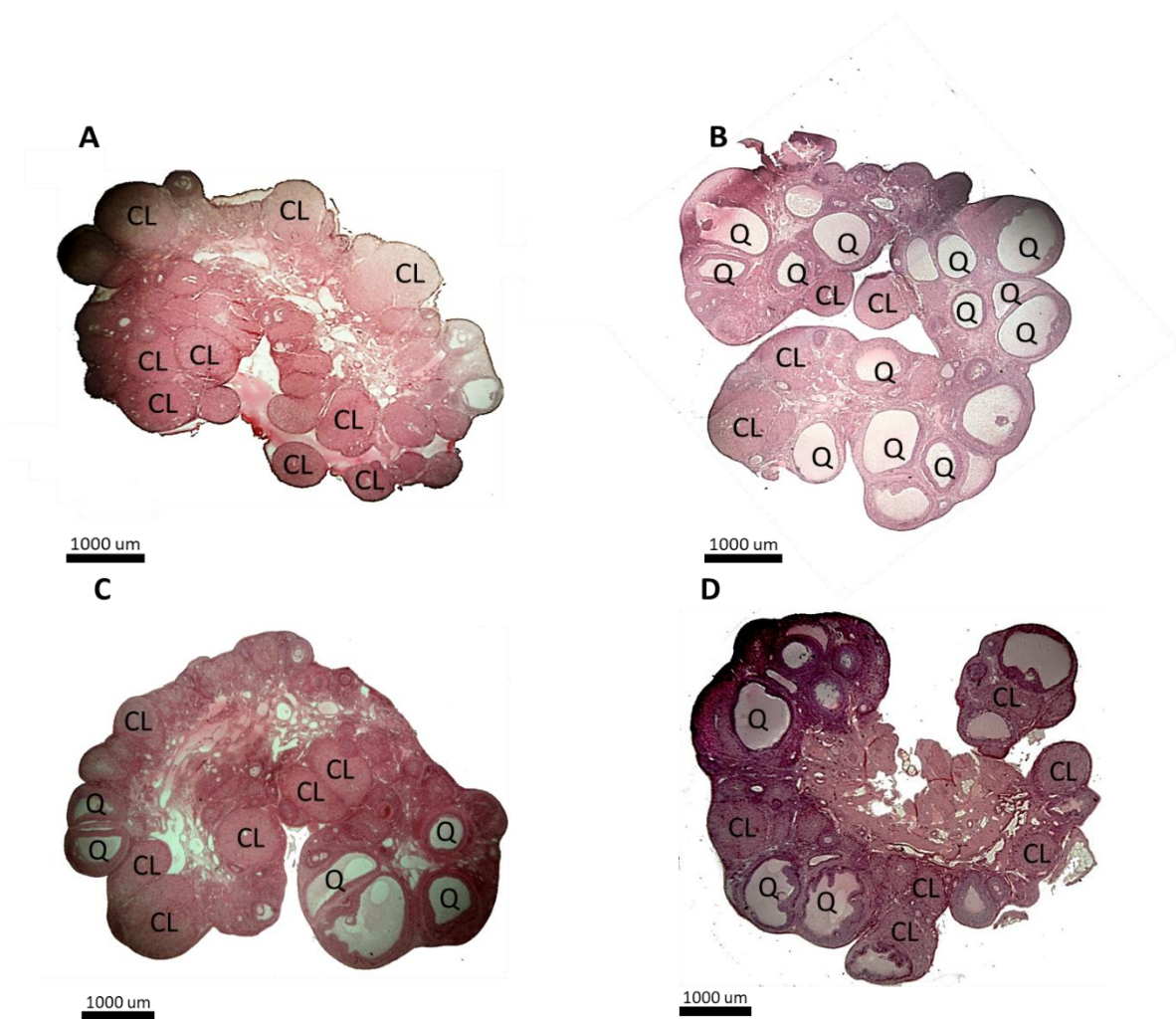
**Figura 21.** Efecto de la exposición a estrés por frío de 4 semanas y tratamiento farmacológico sobre los niveles proteicos de AChE total en ovario rata adulta. Imagen representativa de las bandas encontradas a los 100 kd para AChE y 35 kd para GAPDH



**Figura 22.** Efecto de la exposición a estrés por frío de 4 semanas y tratamiento farmacológico sobre los niveles proteicos de AChE total. Los grupos corresponden a Control-Sham (Naranja), Estrés-Sham (Azul), Estrés-Hup-A (Verde) y Estrés-Hup-A – Atropina (Negro). Unidades arbitrarias expresadas como media  $\pm$  SEM ( $n=4$  Control-Sham,  $n=5$  Estrés-Sham,  $n=5$  Estrés Hup-A y  $n=4$  Estrés-Hup-A – Atropina).

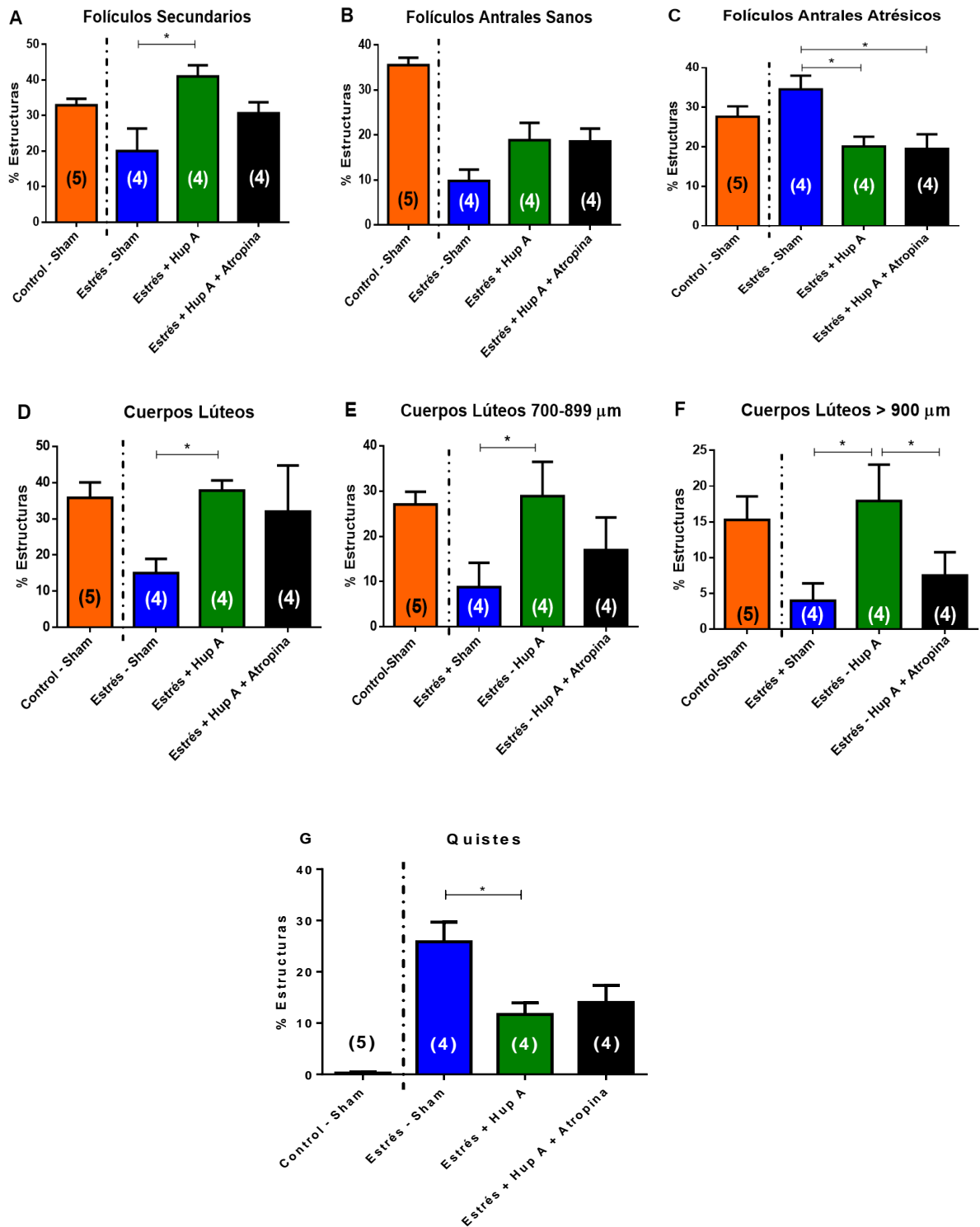
## Determinación del desarrollo folicular en ratas tratadas con Hup-A posterior a estrés

La figura 23 muestra fotografías representativas del grupo Control-Sham (A), Estrés-Sham (B), Estrés-Hup-A (C) y Estrés- Hup-A -Atropina (D), al final del periodo de estrés y de tratamiento farmacológico (fig.5).



**Figura 23.** Imágenes representativas de un corte central obtenido alrededor de la mitad del ovario de ratas pertenecientes a los grupos Control-Sham (A), Estrés-Sham (B), Estrés-Hup-A(C) y Estrés- Hup-A -Atropina (D). Los cuerpos lúteos son señalados con las letras CL, y los quistes son señalados con la letra Q.

La cuantificación porcentual de las estructuras ováricas es mostrada en la figura 24. Se puede observar en el grupo Estrés-Sham una disminución de los folículos secundarios (fig. 24A). También hubo una disminución en los folículos antrales (fig. 24B) y un aumento en los folículos antrales atrésicos (fig. 24C). Finalmente, se observa en este grupo una disminución de los cuerpos lúteos (fig. 24D), con una disminución de las estructuras más grandes (fig. 24E, F), y un aumento en los quistes (fig. 24G). En el grupo Estrés-Hup-A se observa una recuperación en los folículos secundarios (fig. 24A), un aumento en los cuerpos lúteos (fig. 24D), con un aumento en las estructuras de mayor tamaño (fig. 22E, F) y una disminución en los quistes (fig. 24G). En este grupo no hay cambios en los folículos antrales sanos (fig. 24B) y atrésicos (fig. 24C). Finalmente, en el grupo Estrés-Hup-A -Atropina no se observa una recuperación en los folículos secundarios (fig. 24A), no hay diferencias en los cuerpos lúteos comparados con el grupo Estrés-Sham y Estrés Hup-A (fig. 24E). En este grupo no hay cambios en los folículos antrales sanos (fig. 24D), folículos antrales atrésicos (fig. 22E), ni en el número de quistes (fig.22G).

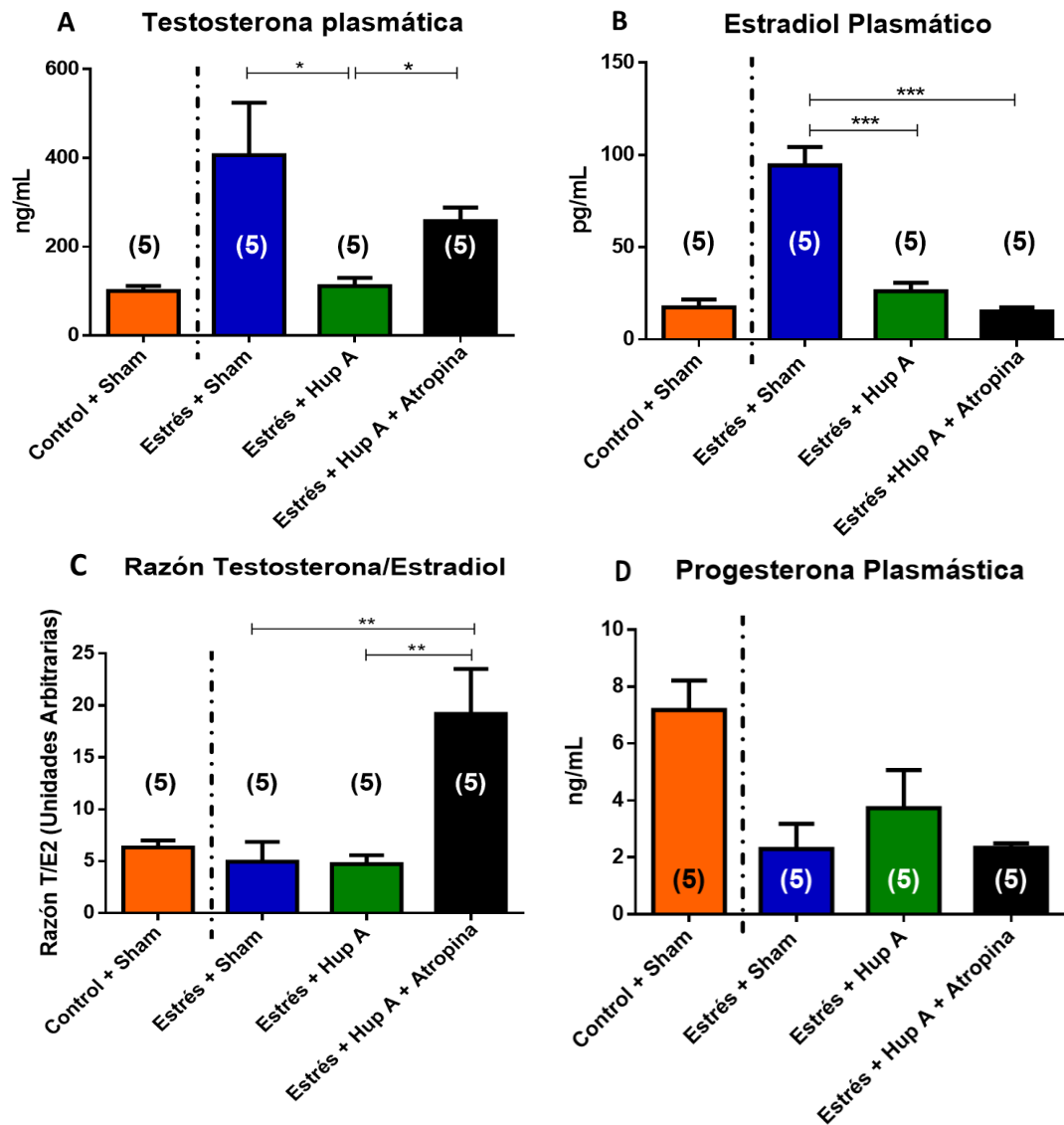


**Figura 24.** Efecto de la exposición a estrés por frío de 4 semanas seguido de tratamiento farmacológico sobre el porcentaje de estructuras foliculares. Los grupos corresponden a Control-Sham (Naranja), Estrés-Sham (Azul), Estrés-Hup-A (Verde) y Estrés-Hup-A – Atropina (Negro). Resultados expresados media  $\pm$  SEM ( $n=5$  Control-Sham,  $n=4$  Estrés-Sham,  $n=4$  Estrés Hup-A y  $n=4$  Estrés-Hup-A – Atropina). \* $P<0.05$



### **Determinación de los niveles de hormonas esteroidales en ratas tratadas con Hup-A posterior a estrés**

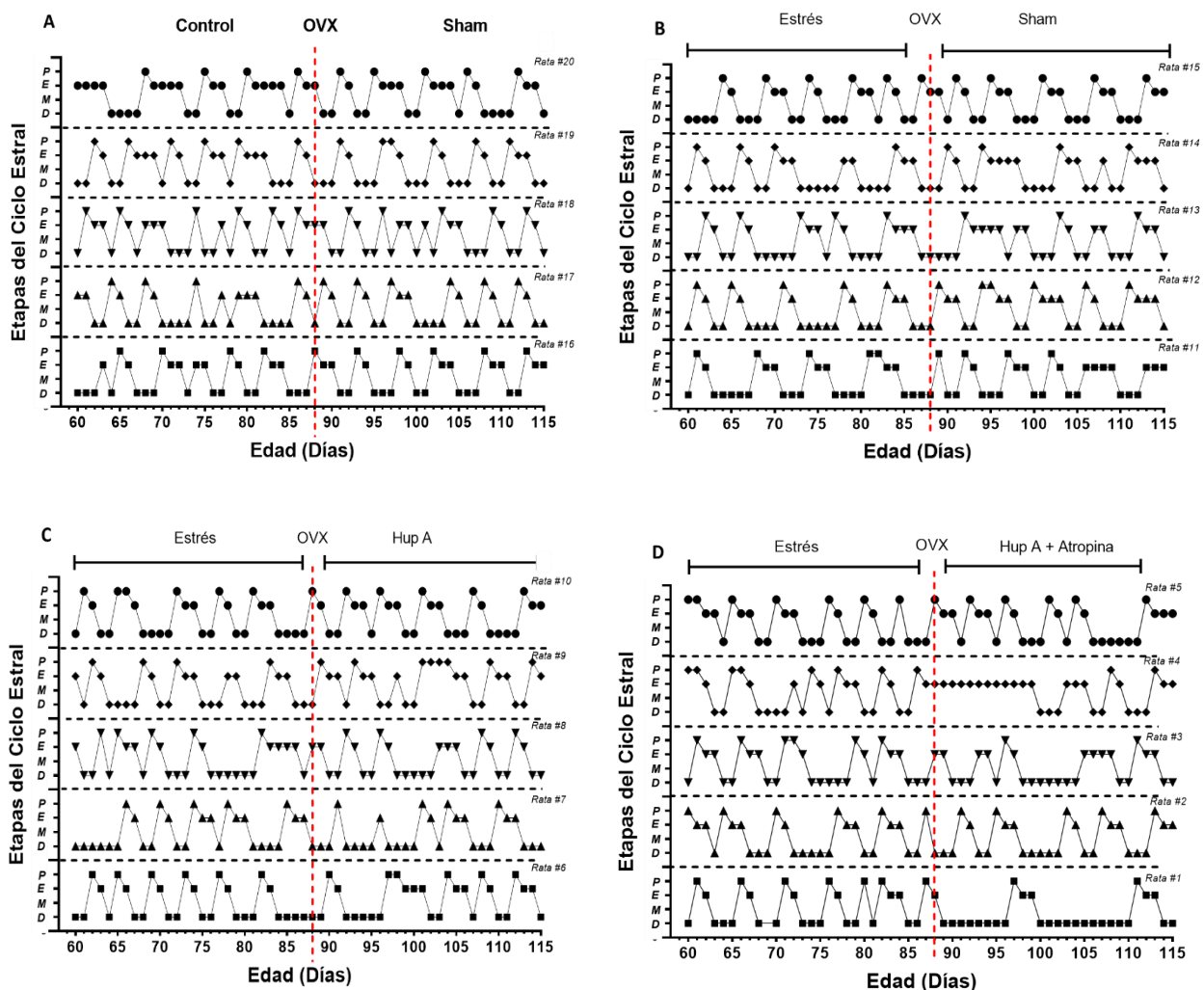
En la figura 25 se describen los niveles plasmáticos de T, E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> y la razón T/E<sub>2</sub>. En el grupo Estrés-Sham se encuentran aumentados los niveles de T (fig. 25A), E<sub>2</sub> (fig. 25B) y disminuidos los niveles de P<sub>4</sub> (fig. 25C). Por otra parte, en el grupo Estrés-Hup-A disminuyen a niveles control los niveles de T (fig. 25A) y E<sub>2</sub> (fig. 25B), sin encontrar cambios en los niveles de P<sub>4</sub> (fig. 25C). Finalmente, en el grupo Estrés-Hup-A -Atropina encontramos aumentados los niveles de T (fig. 25A), disminuidos los niveles de E<sub>2</sub> (fig. 25B) y los niveles de P<sub>4</sub> (fig. 25C). Al medir la razón T/E<sub>2</sub> encontramos un aumento en este grupo (fig. 25D).



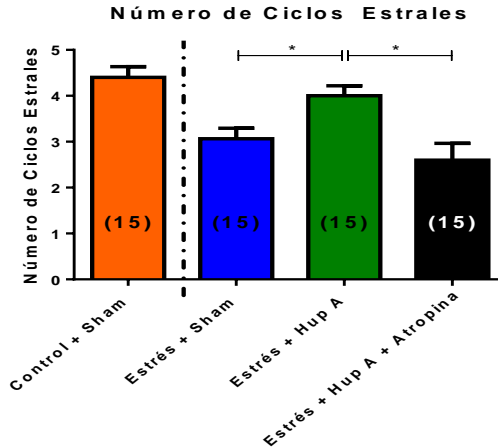
**Figura 25.** Efecto de la exposición a estrés por frío de 4 semanas seguido de tratamiento farmacológico sobre los niveles plasmáticos de T (A), E<sub>2</sub> (B), Razón T/ E<sub>2</sub> (C) y P<sub>4</sub> (D) de ratas hembras adultas. Los grupos corresponden a Control-Sham (Naranja), Estrés-Sham (Azul), Estrés-Hup-A (Verde) y Estrés-Hup-A – Atropina (Negro). Resultados expresados media ± SEM (n=5 para cada grupo). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.01

## Ciclicidad estral en ratas tratadas con Hup-A posterior a estrés

La figura 26 muestra los ciclos de ratas de los grupos a Control-Sham (A), Estrés-Sham (B), Estrés-Hup-A (C) y Estrés-Hup-A – Atropina (D). Estos ciclos fueron cuantificados y se encuentra una disminución en el grupo Estrés-Sham, que se revierte en el grupo Estrés-Hup-A -Atropina, pero no en el grupo Estrés- Hup-A – Atropina (fig. 27).



**Figura 26.** Ciclos representativos de los grupos sometidos a el protocolo de fertilidad. La línea roja punteada representa el término del periodo de estrés. Los grupos corresponden a Control-Sham, Estrés-Sham, Estrés-Hup-A y Estrés-Hup-A – Atropina.



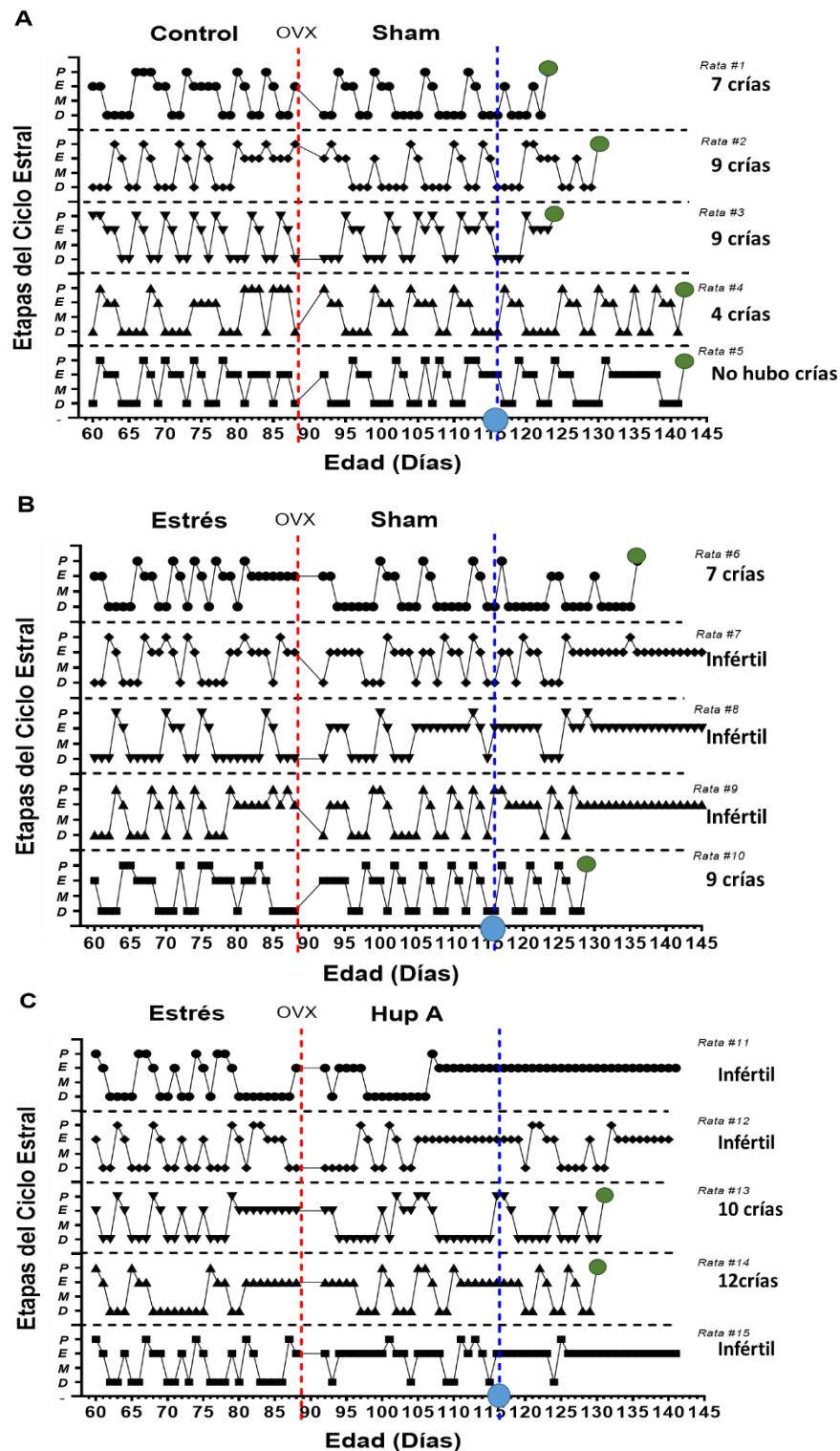
**Figura 27.** Número de ciclos estrales. Se cuantificaron los pasos P-E-D para determinar cada ciclo. Los grupos corresponden a Control-Sham (Naranja), Estrés-Sham (Azul), Estrés-Hup-A (Verde) y Estrés-Hup-A – Atropina (Negro). Resultados representan la media  $\pm$  SEM (n=15). \*P<0.05

### Ciclicidad estral y fertilidad de ratas tratadas con Hup-A posterior a estrés

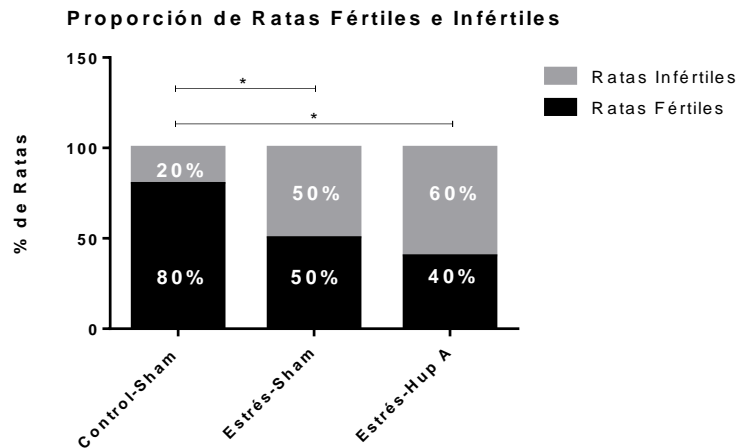
En la figura 28 se muestran los ciclos representativos de las ratas, el número de animales infértiles y la cantidad de crías al final del protocolo, en los grupos Control-Sham (A), Estrés-Sham (B) y Estrés-Hup-A (C). Al cuantificar porcentualmente la razón entre animales fértiles e infértiles, encontramos una disminución en el grupo Estrés-Sham y en el grupo Estrés-Hup-A (fig. 29).

En la figura 30 se muestran fotografías representativas de los cuernos uterinos de ratas de los grupos Control-Sham, Estrés-Sham, Estrés-Hup-A y de ratas clasificadas como infértiles. Al cuantificar los implantes en los cuernos uterinos no encontramos diferencias entre los grupos (fig. 31A).

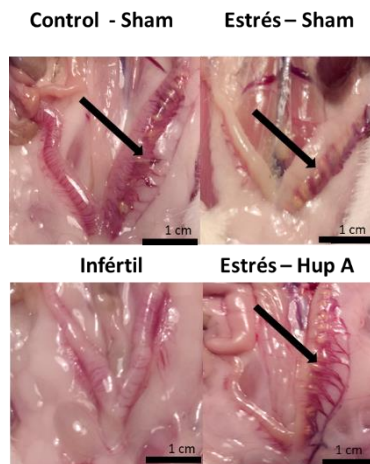
Finalmente, no se encontraron diferencias en el número de crías (fig. 31B), ni en la proporción de machos y hembras de los diferentes grupos experimentales (fig. 31C).



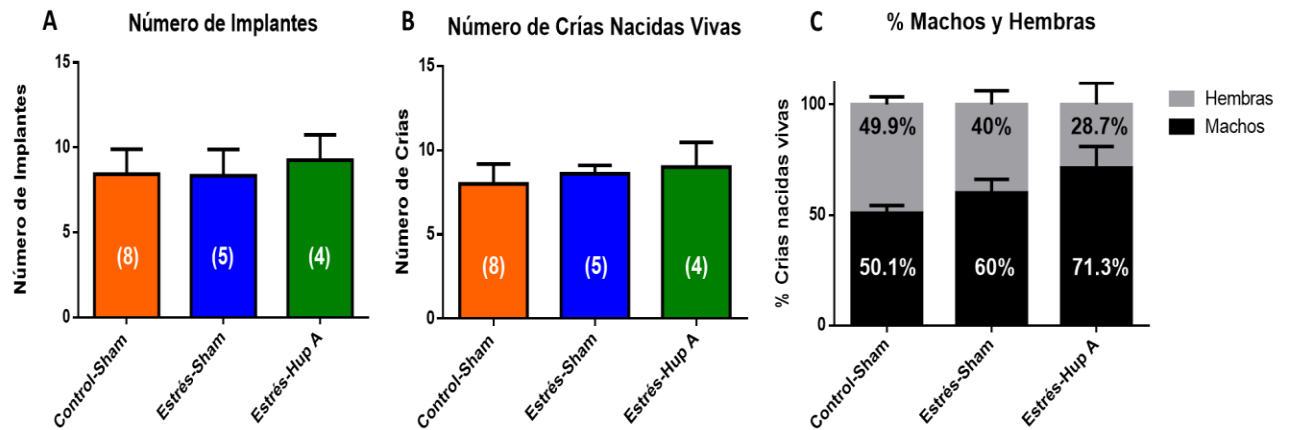
**Figura 28.** Ciclos representativos de los grupos sometidos a el protocolo de fertilidad. La línea roja punteada representa el término del periodo de estrés, la línea azul el término del periodo de administración de fármaco, el punto azul (●) representa el día que comienzan las cruza con machos fértiles y el punto verde (●) el día en el cual la rata presentó un proestro seguido de una crusa efectiva con machos.



**Figura 29.** Tasa de Fertilidad entre ratas Infértiles (gris) y ratas fértiles (negro). Los grupos corresponden a Control-Sham, Estrés-Sham y Estrés-Hup-A, (n=10 para cada grupo) \*P<0.05



**Figura 30.** Imágenes representativas de los cuernos uterinos. Las flechas muestran los puntos de implantación en el cuerno uterino en los grupos Control-Sham, Estrés-Sham y Estrés-Hup-A que tuvieron cruces efectivas y en una rata clasificada como infértil que no tuvo puntos de implantación.



**Figura 31.** Número de implantes (A) y Número de crías nacidas vivas (B). Los grupos corresponden a Control-Sham (Naranja), Estrés-Sham (Azul) y Estrés-Hup-A (Verde). Resultados representan la media  $\pm$  SEM ( $n=8$  Control-Sham,  $n=5$  Estrés-Sham y  $n=4$  Estrés Hup-A). Tasa de hembras (gris) y machos (negro)(C). Los grupos corresponden a Control-Sham (Izquierda), Estrés-Sham (Centro) y Estrés-Hup-A (Derecha). Resultados porcentuales expresados como media  $\pm$  SEM ( $n=8$  Control-Sham,  $n=5$  Estrés-Sham y  $n=4$  Estrés Hup-A).

## DISCUSIÓN

La exposición a estrés por frío de cuatro semanas aumenta los niveles de NA en el ovario, tal como ha sido descrito en la literatura (Dorfman et al., 2003, Bernuci et al., 2008, Bernuci et al., 2013, Barra et al., 2014). Adicionalmente, en estas ratas los niveles de ACh en el ovario se encuentran aumentados al igual que la actividad de la AChE. Esta descrito que el estrés por frío crónico aumenta los niveles de NGF al término de las 4 semanas (Dorfman et al., 2003), y recientemente ha sido descrito que NGF es capaz de aumentar los niveles de ChAT en cultivos de células de granulosa ovárica (Meinel et al., 2015). En este sentido, los niveles de NGF elevados por el estrés por frío podrían haber inducido un aumento de ChAT, y en consecuencia generar un incremento en los niveles de ACh. Por otro lado, la actividad aumentada de AChE puede deberse a un incremento en los niveles de la proteína o de la actividad catalítica de la enzima, y en estas ratas encontró el mensajero y la proteína de AChE aumentados. Este aumento del contenido de ACh y de la actividad de AChE en respuesta al estrés, ha sido reportado en zonas cerebrales como Hipocampo y núcleo caudado, en donde se observa que el estrés aumenta la liberación vesicular de ACh, la cual es independiente de los niveles de corticoesteroides (Imperato et al., 1991). Adicionalmente, el aumento de ACh en corteza cerebral produce un incremento en los niveles de ARNm de AChE, vía activación del gen temprano c-fos por activación de receptores muscarínicos (Kaufer et al., 1998). Sin embargo, puede resultar paradójico que los niveles de ACh se encuentren aumentados en ovario al mismo tiempo que la actividad de la AChE. Esto se podría explicar debido a que la ACh se encuentra almacenada al



interior de la células y solo se encuentra disponible para ser degradada cuando se libera al medio extracelular para ejercer sus efectos sobre los receptores nicotínicos y muscarínicos (Soreq and Seidman, 2001).

De igual forma, al analizar los efectos del estrés por frío de cuatro semanas sobre el desarrollo folicular, encontramos una disminución en los folículos secundarios, en los folículos antrales sanos, así como también un aumento en la atresia folicular, pero sin observar estructuras quísticas. Estas alteraciones en el desarrollo folicular han sido descritas anteriormente (Dorfman et al., 2003). Adicionalmente, encontramos una disminución al analizar el número de cuerpos lúteos. Dado que el estrés por frío produce estas alteraciones en el desarrollo folicular en conjunto con el incremento de NA y ACh, podríamos pensar que estos cambios son producto de la interacción crónica de estos neurotransmisores con sus receptores. Pero como fue señalado anteriormente, la AChE se encuentra aumentada fuera de la célula, por lo que la ACh no estaría disponible para ejercer sus efectos en los receptores colinérgicos. En consecuencia, la estimulación crónica de los receptores beta adrenérgicos del ovario produciría las alteraciones en el desarrollo folicular inducidas por estrés. En este sentido, está descrito que la administración crónica de agonistas beta adrenérgicos puede producir alteraciones en el desarrollo folicular como quistes (Luna et al., 2012). Por lo anterior, sería interesante analizar los efectos de la administración crónica de agonistas adrenérgicos y colinérgicos simultáneamente, para poder observar si existe una predominancia en el efecto sobre alguno de los sistemas, y los efectos sobre el desarrollo folicular, para posteriormente modular su reversión mediante fármacos.

Adicionalmente, el estrés por frío de cuatro semanas aumenta la concentración plasmática de T, sin cambios en los niveles de E<sub>2</sub>. Está descrito en este modelo de

estrés la generación de folículos antrales con hipertecosis (Dorfman et al., 2003, Zangeneh et al., 2011, Park et al., 2012). Estos folículos producen altos niveles de andrógenos, por lo que este aumento en los niveles de T se debe a estas estructuras anormales. Por otro lado, podemos observar una disminución en los niveles de P<sub>4</sub> la cual se asocia directamente con un descenso en el número de cuerpos lúteos, los cuales son los encargados de la síntesis y secreción de P<sub>4</sub> posterior a la ovulación. A pesar de tener una disminución en los cuerpos lúteos y niveles bajos de P<sub>4</sub>, el estrés por frío de cuatro semanas no produce cambios en el número de ciclos estrales. Los ciclos estrales son indicadores de la funcionalidad del eje HHO, las células encontradas mediante frotis vaginales son consecuencia de las fluctuaciones de las hormonas esteroidales y gonadotrofinas (Ojeda, 2012, Uchida, 2015, Pastelín et al., 2017), por lo que, podemos inferir que el eje HHO aún se encuentra regulando la ciclicidad del ovario.

Estos resultados nos permitieron tener un conocimiento preliminar sobre la respuesta del sistema colinérgico ovárico al estrés, específicamente de los niveles de ACh y AChE. En este sentido, frente a una sobreactivación de ambos sistemas por estrés por frío, el sistema simpático (NA) predomina sobre el sistema colinérgico (ACh), lo que se debe a que la enzima que degrada la ACh también se encuentra aumentada. En consecuencia, la inhibición farmacológica de la AChE potenciaría los efectos de la ACh sobre el desarrollo folicular.

Desde el punto de vista metodológico, existe evidencia que indica que la ovariectomía unilateral produce una hipertrofia compensatoria del ovario contralateral, aumentando el peso, tamaño y número de estructuras del ovario (Chávez and Domínguez, 1994, Trkulja et al., 2004, Morales-Ledesma et al., 2011). Esta hipertrofia del ovario va mediada por acción del sistema colinérgico local del

ovario, en donde se ha descrito un aumento en los niveles de ACh y una disminución en la actividad de la enzima AChE (Trkulja et al., 2004). Todos estos cambios compensatorios generales no tienen una mayor implicancia para los resultados finales, porque las diferencias desaparecen cuando los datos se normalizan por tamaño. Sumado a lo anterior, se demostró que la administración de Hup-A 10  $\mu$ M por 28 días en ratas ovariectomizadas produce un incremento en la concentración intraovárica de ACh de 10  $\mu$ M (Urra et al., 2016). El fármaco Hup-A tiene una vida media de 203 minutos en rata, se metaboliza principalmente vía hepática y renal, y no cruza la barrera hematoencefálica (Damar et al., 2016). Por otra parte, la Atropina es un antagonista competitivo de los receptores muscarínicos, con una afinidad 100 veces mayor que la ACh, lo que produciría un desplazamiento a la derecha de la curva dosis respuesta dependiente de la concentración (Wang et al., 2019), es decir, se necesitaría una concentración mayor de ACh para producir el efecto en los receptores muscarínicos (Brunton, 2012). A pesar de ser administrado localmente, el fármaco puede difundir a través del parénquima del ovario hacia la sangre y distribuirse en el resto de los tejidos, sin embargo, no alcanzaría concentraciones plasmáticas suficientes para producir efectos a nivel periférico y central.

Como se observó previamente el estrés por frío de 4 semanas produce un incremento de los niveles de NA ovárica (Dorfman et al., 2003), que se mantiene 4 semanas posterior al término del estrés. Este efecto sobre los niveles de NA ha sido descrito anteriormente, en conjunto con un aumento en el metabolito 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) (Bernuci et al., 2013). De la misma forma, la administración de Hup-A incrementa los niveles de NA. Ha sido descrito en la literatura que los inhibidores de la AChE producen mayores niveles de NA a través

del aumento en la actividad de la tirosina hidroxilasa (Ulus and Wurtman, 1979, Zhu et al., 1996, Liang and Tang, 2006). Sin embargo, la administración de Hup-A y Atropina simultáneamente no produjo cambios en los niveles de NA. La Atropina es un antagonista competitivo de los receptores muscarínicos, por lo que se infiere que el aumento de NA inducido por la inhibición de la AChE es un efecto mediado por la interacción de la ACh con los receptores muscarínicos. Por otro lado, hemos descrito que el contenido de ACh ovárica se incrementa debido al estrés y posterior al término del estrés disminuye a niveles control. Si consideramos que se ha descrito que NGF aumenta los niveles de ChAT en células de granulosa (Meinel et al., 2015), y adicionalmente, que los niveles de NGF en ovario se incrementan al final del periodo de estrés (Dorfman et al., 2003) y disminuyen posterior al estrés (Bernuci et al., 2013), NGF podría estar mediando tanto el aumento de ACh como la disminución al final del periodo post estrés. Sumado a lo anterior, la administración de Hup-A produce una disminución en la actividad enzimática de la AChE, sin embargo, este efecto se observó en todos los grupos. Si consideramos que la actividad de la AChE disminuye por efecto de la ovariectomía (Trkulja et al., 2004), el descenso en la actividad de la AChE en estrés sería consecuencia del efecto de la ovariectomía. Si consideramos que solo en las ratas que fueron administradas con Hup-A se incrementaron los niveles de ACh, no podemos descartar un efecto sobre los niveles de ChAT aumentando su actividad enzimática o los niveles proteicos.

Tal como ha sido descrito previamente, el estrés por frío produjo alteraciones en el desarrollo folicular (aumento de quistes, disminución de los cuerpos lúteos). Estos resultados son consistentes con la literatura (Bernuci et al., 2013, Squicciarini et al., 2018), en donde los cambios encontrados al final de las cuatro semanas de estrés,

se profundizan aún más cuatro semanas post estrés, desplazando el desarrollo folicular hacia la formación de quistes ováricos, aumentando la atresia y disminuyendo el número de cuerpos lúteos. La administración de Hup-A detiene la progresión de las alteraciones en el desarrollo folicular producidas por el estrés por frío. Existe evidencia en la cual la utilización de Hup-A en ratas adultas aumenta la fertilidad (Urria et al., 2016) y además tiene efectos sobre el crecimiento de los folículos antrales y del ovocito en primates (Du et al., 2018). El estrés altera el desarrollo folicular, disminuyendo el reclutamiento folicular inicial, aumentando la atresia folicular y disminuyendo los cuerpos lúteos y formando quistes, pero el tratamiento con Hup-A detiene estos efectos en el desarrollo folicular, aumenta el número de cuerpos lúteos y disminuye los quistes ováricos. Sin embargo, la administración de atropina en conjunto con Hup-A, no mostró diferencias al ser comparado con el grupo que solo fue administrado con Hup-A, por lo que aparentemente el efecto sobre el desarrollo folicular no estaría asociado a la interacción de la ACh con los receptores muscarínicos del ovario. En este sentido Hup-A ha demostrado tener otros efectos, por ejemplo, neuroprotectivos asociados a la activación de receptores nicotínicos. A través de los receptores nicotínicos, Hup-A disminuye la liberación de las citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , y la activación de NF- $\kappa$ B, y de esta forma dando un efecto antiinflamatorio y protector del estrés oxidativo (Damar et al., 2016). El ovario posee receptores nicotínicos Na(v)1.7 en las células de granulosa (Mayerhofer and Kunz, 2006), por lo que podríamos asociar los efectos observados en la recuperación de la foliculogénesis por Hup-A asociado a un efecto sobre el receptor nicotínico.

Sumado a los efectos que el estrés por frío produce en la foliculogénesis, ha sido descrito que produce un aumento en los niveles de andrógenos (Bernuci et al., 2013, Squicciarini et al., 2018). La presencia de quistes está relacionada a una mayor producción de T (Barria et al., 1993, Domínguez and Cruz-Morales, 2011, Espinoza et al., 2018), y este aumento de T otorgaría a las células de granulosa un mayor sustrato a la enzima P-450 aromatasa para la síntesis de E<sub>2</sub>, lo que explicaría el aumento de esta hormona. Adicionalmente, esta descrito que el aumento de T produce atresia folicular y anovulación en rata (Sánchez-Criado et al., 1993), por lo que los altos niveles de T en ratas sometidas a estrés puede contribuir directamente al incremento en la atresia folicular. Por otro lado, la P<sub>4</sub> se sintetiza en los cuerpos lúteos, y hemos descrito que en este el estrés disminuye estas estructuras, por lo que la disminución de esta hormona se debería a la disminución de las estructuras que se encargan de su síntesis. En contraste, la administración de Hup-A restablece los niveles de T y E<sub>2</sub>. Esta disminución en los niveles de T se relaciona con la disminución en los quistes, y habiendo disminuido la T, hay menos sustrato disponible para la síntesis de E<sub>2</sub>. Sin embargo, Hup-A no restablece los niveles plasmáticos de P<sub>4</sub>, la cual es producida por los cuerpos lúteos, y si bien porcentualmente se restablecieron estas estructuras foliculares, el número no es suficiente para poder reestablecer los niveles plasmáticos de P<sub>4</sub>. Finalmente, la administración de atropina en conjunto con Hup-A produce un aumento en los niveles plasmáticos de T y una disminución en los niveles de E<sub>2</sub>. Es interesante señalar que a pesar de que el sustrato para la síntesis de E<sub>2</sub> se encuentre aumentado el producto no aumente, y la razón entre los niveles de T/E<sub>2</sub>, también se encuentra aumentada. Existe evidencia que señala que en cultivos de células de granulosa humana, la ACh y agonistas muscarínicos como carbacol contribuyen

a aumentar la síntesis de  $E_2$ , y que la atropina disminuye la síntesis de esta hormona (Kornya et al., 2001). Esto sugiere que la Atropina podría estar mediando la disminución en los niveles de  $E_2$ , mediante algún mecanismo asociado por ejemplo a la disminución en la actividad de la P-450 aromatasa o a producir menores niveles de esta enzima en ovario. Considerando los cambios producidos a nivel hormonal por el estrés, el número de ciclos disminuidos sería consecuencia directa de estas alteraciones, lo que podría implicar un menor número de ovulaciones. La administración de Hup-A normaliza los niveles de T y  $E_2$ , además de recuperar el desarrollo folicular, por lo que el restablecimiento del número de ciclos sería un indicador de la recuperación de la función ovárica. Por el contrario, la administración de atropina en conjunto con Hup-A no revertiría la disminución en los ciclos estrales, por lo que aparentemente sería un efecto dependiente de los receptores muscarínicos.

Si consideramos que el ovario participa en la función reproductiva y que el estrés por frío altera la foliculogénesis y los niveles plasmáticos de hormonas esteroidales, la consecuencia de estas alteraciones es la disminución de la tasa de fertilidad de las ratas. Esta disminución en la fertilidad de las ratas hembra, sumada al aumento de quistes, el hiperandrogenismo y la disminución en el número de ovulaciones, son características de un fenotipo de ovario poliquístico en rata (Barria et al., 1993, Domínguez and Cruz-Morales, 2011). La administración de Hup-A no revierte la baja en la tasa de fertilidad, a pesar de detener las alteraciones en la dinámica folicular, restablecer los niveles hormonales de T y  $E_2$ , y recuperar el número de ciclos estrales. Sin embargo, un porcentaje de las ratas sometidas a estrés por frío se cruza efectivamente. En este sentido, se ha descrito en otros trabajos que un tipo de estrés, el estrés gestacional, puede afectar la fertilidad de las crías de las ratas,

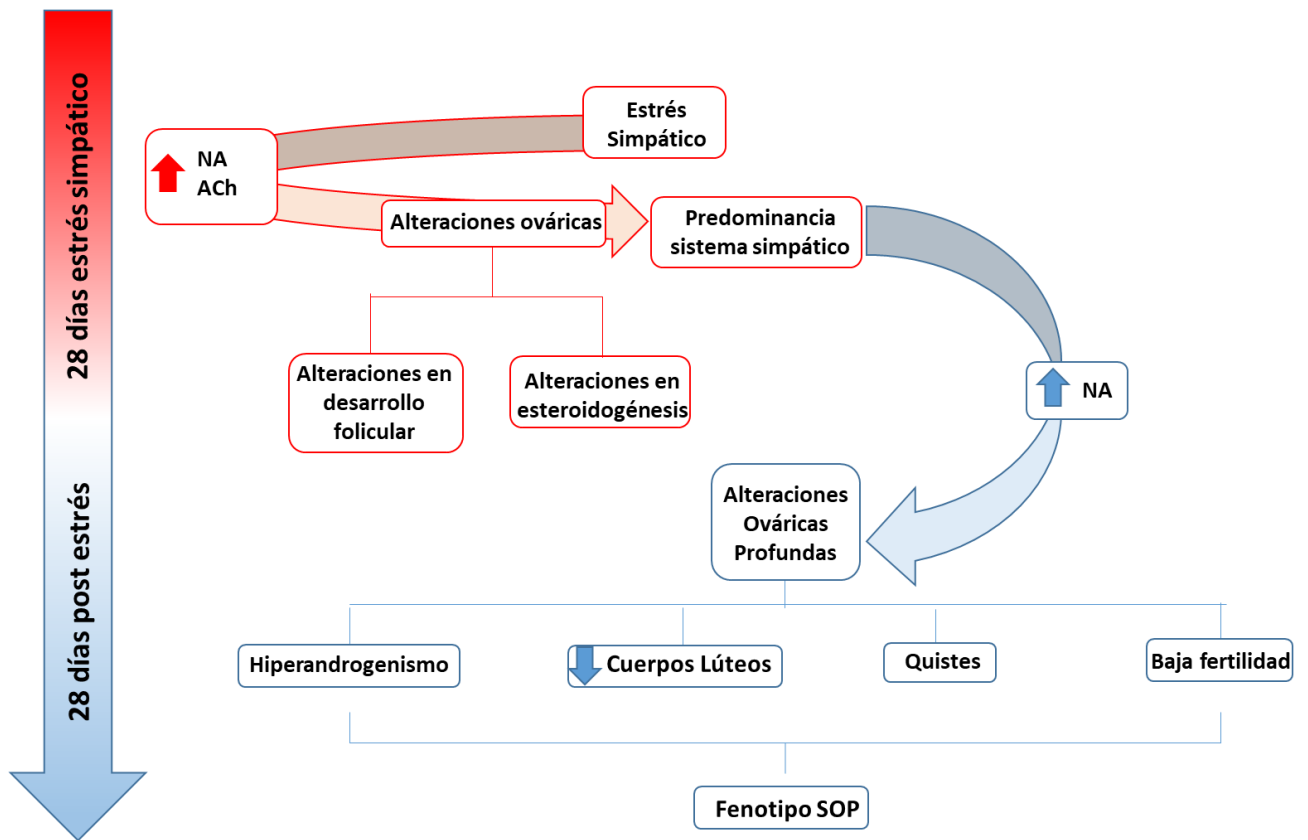
incluso disminuyendo aún más en la siguiente generación (Piquer et al., 2017). Esto quiere decir que en un grupo de ratas que fue sometido a algún estrés, un porcentaje de estas mantiene su capacidad reproductiva. Por otro lado, considerando que todas las ratas que fueron administradas con Hup-A tuvieron cruza efectivas con machos fértiles, el problema en la disminución en la tasa de fertilidad podría estar asociado a la calidad del ovocito ovulado, o a la implantación. Podría ser interesante estudiar los efectos del estrés en la calidad de los ovocitos, ya que está descrito en mujeres que el estrés podría estar afectando en ovocitos el crecimiento, maduración e incluso produciendo su envejecimiento (Da Broi and Navarro, 2016). Además, si consideramos que para la implantación del ovulo fecundado se requieren niveles altos de  $P_4$ , debemos considerar que el tratamiento con Hup-A no reestablece los niveles de esta hormona, por lo que habría una consecuencia directa en la implantación del óvulo fecundado. Adicionalmente, está descrito en mujeres con niveles de NA elevados en fluido folicular producto de estrés, que la fertilidad disminuye y que los tratamientos de fertilización *in vitro* en estas mujeres tienen menor efectividad que en mujeres con niveles bajos de NA (An et al., 2011). En el grupo de ratas estresadas que tuvieron tratamiento con Hup-A, los niveles de NA ovárica se encuentran aún más elevados que en el grupo estresado que no recibió tratamiento, por lo que es probable que puedan producir una alteración en la implantación. Finalmente, existe evidencia en ratones que han recibido estrés crónico por inmovilización y en presencia de agonistas y antagonistas adrenérgicos, que se produce endometriosis mediada por receptores beta-adrenérgicos del útero, lo que está descrito como una consecuencia directa de la infertilidad en animales y humanos (Long et al., 2016, Fanning et al., 2017).



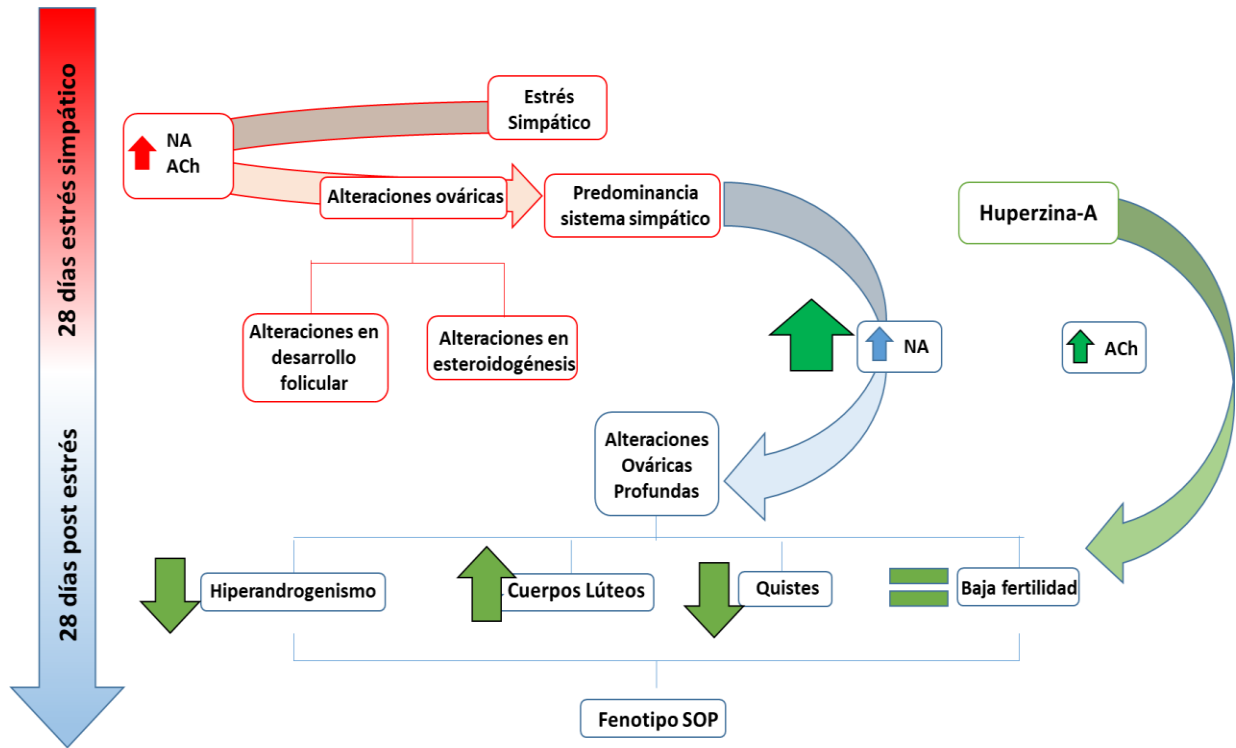
Considerando todo lo anterior, el estrés por frío de 4 semanas produce un aumento de NA y ACh. La NA predomina sobre la ACh produciendo alteraciones en la función ovárica. Posteriormente, cuatro semanas después del periodo de estrés, la NA sigue elevada mientras que la ACh vuelve a niveles basales. Como consecuencia, las alteraciones en la función ovárica se profundizan apareciendo quistes ováricos, hiperandrogenismo e infertilidad. El tratamiento crónico con Hup-A, incrementa los niveles de ACh, pero además incrementa aún más los niveles de NA, por lo que la recuperación de las alteraciones en el desarrollo folicular y esteroidogénesis es parcial, y no se recupera la fertilidad. Si consideramos que en mujeres con SOP las alteraciones de alto riesgo como el daño cardiovascular y los efectos metabólicos van ligados a los altos niveles de andrógenos, podríamos considerar el tratamiento con Hup-A como parte del arsenal farmacológico para tratar el SOP.

Todo lo anterior sugiere que la utilización del sistema colinérgico local del ovario es una alternativa para revertir las alteraciones producidas por estrés, pero se deben buscar alternativas farmacológicas diferentes, es decir, un fármaco que tenga efecto específico sobre otros blancos colinérgicos diferentes a los considerados en este trabajo, como el receptor nicotínico del ovario, y que además, no tenga efecto estimulador sobre el sistema nervioso simpático, como es el caso de todos los inhibidores de la AChE (Ulus and Wurtman, 1979, Zhu et al., 1996, Liang and Tang, 2006). Frente a estos antecedentes, planteamos que la Galantamina, un fármaco utilizado ampliamente en enfermedad de Alzheimer podría tener mejores resultados, debido a que es un inhibidor de la AChE y además modula específicamente el receptor nicotínico de forma alostérica positiva (Stahl, 2000). Además, la utilización de nicotina como ligando específico de este receptor mediante el uso de nano vesículas dirigidas para el receptor de FSH, podrían dirigir

específicamente este fármaco hacia el ovario y de esta forma producir un efecto específico local (Dani and De Biasi, 2001, Rodrigues and Rowland, 2019). En consecuencia, se dejan abiertas nuevas posibilidades para el tratamiento del fenotipo SOP en rata, proyectándolo a una posible herramienta en el tratamiento del SOP en pacientes humanos.



**Figura 32.** Efecto temporal del estrés por frío en el Sistema simpático y el Sistema colinérgico local. En rojo está representado el periodo de estrés de 4 semanas, en el cual aumentan NA y ACh y se generan alteraciones en la función ovárica. En azul está representado el periodo post estrés, en el cual la NA aún permanece alta, lo que produce alteraciones en la función ovárica más profundas que originan un fenotipo SOP. Existe una predominancia del sistema nervioso simpático sobre el sistema colinérgico local.



**Figura 33.** Efecto de la administración crónica de Hup-A post estrés sobre los niveles de NA y ACh. En verde está representado el efecto de Hup-A en el periodo post estrés. Los niveles de ACh aumentan, pero los niveles de NA aumentan aún más, se revierte el hiperandrogenismo, aumentan los cuerpos lúteos, disminuyen los quistes ováricos, pero las ratas no son más fértiles. Existe una reversión parcial de las disfunciones ováricas inducidas por estrés.

## **RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS**

El estrés por frío activa el sistema simpático y el sistema colinérgico local del ovario aumentando los niveles de NA, ACh y la actividad de la AChE, lo que produce alteraciones en la función ovárica. Al realizar un tratamiento crónico intraovárico con Hup-A, se revierten parcialmente las alteraciones en el desarrollo folicular, disminuyendo los quistes y aumentando los cuerpos lúteos, y adicionalmente, se revierte el hiperandrogenismo, los cuales fueron inducidos por estrés. Sin embargo, el tratamiento crónico intraovárico con Hup-A no recupera la disminuida tasa de fertilidad inducida por estrés.

## **CONCLUSIÓN GENERAL**

El estrés por frío activa tanto el sistema nervioso simpático como el sistema colinérgico local del ovario, y frente a la activación de ambos sistemas predomina el sistema nervioso simpático, produciendo alteraciones en la función ovárica que originan un fenotipo SOP. La estimulación farmacológica del sistema colinérgico del ovario con Hup-A revierte parcialmente el fenotipo SOP, pero no logra restablecer la fertilidad de las ratas estresadas, debido que además de aumentar de manera crónica los niveles de ACh aumenta aún más los niveles de NA, los cuales tienen efectos antagónicos sobre la regulación de la función ovárica. De esta forma dejamos planteado para futuras investigaciones que la utilización de agonistas del receptor nicotínico del ovario, podrían producir resultados más favorables en el tratamiento del fenotipo SOP.

## BIBLIOGRAFÍA

1. AGUADO, L. I. 2002. Role of the central and peripheral nervous system in the ovarian function. *Microsc Res Tech*, 59, 462-73.
2. AGUADO, L. I., PETROVIC, S. L. & OJEDA, S. R. 1982. Ovarian beta-adrenergic receptors during the onset of puberty: characterization, distribution, and coupling to steroidogenic responses. *Endocrinology*, 110, 1124-32.
3. AN, Y., WANG, Z., JI, H., ZHANG, Y. & WU, K. 2011. Pituitary-adrenal and sympathetic nervous system responses to psychiatric disorders in women undergoing in vitro fertilization treatment. *Fertil Steril*, 96, 404-8.
4. BARRA, R., CRUZ, G., MAYERHOFER, A., PAREDES, A. & LARA, H. E. 2014. Maternal sympathetic stress impairs follicular development and puberty of the offspring. *Reproduction*, 148, 137-45.
5. BARRIA, A., LEYTON, V., OJEDA, S. R. & LARA, H. E. 1993. Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology*, 133, 2696-703.
6. BERNUCI, M. P., LEITE, C. M., BARROS, P., KALIL, B., LEONI, G. B., DEL BIANCO-BORGES, B., FRANCI, C. R., SZAWKA, R. E., LARA, H. E. & ANSELMO-FRANCI, J. A. 2013. Transitory activation of the central and ovarian norepinephrine systems during cold stress-induced polycystic ovary in rats. *J Neuroendocrinol*, 25, 23-33.
7. BERNUCI, M. P., SZAWKA, R. E., HELENA, C. V., LEITE, C. M., LARA, H. E. & ANSELMO-FRANCI, J. A. 2008. Locus coeruleus mediates cold stress-induced polycystic ovary in rats. *Endocrinology*, 149, 2907-16.
8. BLOHBERGER, J., KUNZ, L., EINWANG, D., BERG, U., BERG, D., OJEDA, S. R., DISSEN, G. A., FRÖHLICH, T., ARNOLD, G. J., SOREQ, H., LARA, H. & MAYERHOFER, A. 2015. Readthrough acetylcholinesterase (AChE-R) and regulated necrosis: pharmacological targets for the regulation of ovarian functions? *Cell Death Dis*, 6, e1685.
9. BRAWER, J. R., MUNOZ, M. & FAROOKHI, R. 1986. Development of the polycystic ovarian condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat. *Biol Reprod*, 35, 647-55.
10. BRUNTON, L. L. 2012. Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12e. In: RANDA HILAL-DANDAN, B. C. K. (ed.) [data-resource-id="170349571" data-resource-type="Section" id="pageContent\\_dvClippableContent">](#) Chapter 3: Pharmacodynamics: Molecular Mechanisms of Drug Action.
11. CHÁVEZ, R. & DOMÍNGUEZ, R. 1994. Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of compensatory ovarian hypertrophy: the effects of its section performed on each day of the oestrous cycle. *J Endocrinol*, 140, 197-201.
12. CRUZ, M. E., FLORES, A., ALVARADO, B. E., HERNÁNDEZ, C. G., ZÁRATE, A., CHAVIRA, R., CÁRDENAS, M., ARRIETA-CRUZ, I. & GUTIÉRREZ-JUÁREZ, R. 2015. Ovulation requires the activation on proestrus of M<sub>1</sub> muscarinic receptors in the left ovary. *Endocrine*, 49, 809-19.

13. DA BROI, M. G. & NAVARRO, P. A. 2016. Oxidative stress and oocyte quality: ethiopathogenic mechanisms of minimal/mild endometriosis-related infertility. *Cell Tissue Res*, 364, 1-7.
14. DAMAR, U., GERSNER, R., JOHNSTONE, J. T., SCHACHTER, S. & ROTENBERG, A. 2016. Huperzine A as a neuroprotective and antiepileptic drug: a review of preclinical research. *Expert Rev Neurother*, 16, 671-80.
15. DANI, J. A. & DE BIASI, M. 2001. Cellular mechanisms of nicotine addiction. *Pharmacol Biochem Behav*, 70, 439-46.
16. DEL CAMPO, M., PIQUER, B., WITHERINGTON, J., SRIDHAR, A. & LARA, H. E. 2019. Effect of Superior Ovarian Nerve and Plexus Nerve Sympathetic Denervation on Ovarian-Derived Infertility Provoked by Estradiol Exposure to Rats. *Front Physiol*, 10, 349.
17. DOMÍNGUEZ, R. & CRUZ-MORALES, S. 2011. The Ovarian Innervation Participates in the Regulation of Ovarian Functions. *Endocrinol Metabol Syndrome S4:001*.
18. DORFMAN, M., ARANCIBIA, S., FIEDLER, J. L. & LARA, H. E. 2003. Chronic intermittent cold stress activates ovarian sympathetic nerves and modifies ovarian follicular development in the rat. *Biol Reprod*, 68, 2038-43.
19. DU, Y., BAGNJUK, K., LAWSON, M. S., XU, J. & MAYERHOFER, A. 2018. Acetylcholine and necroptosis are players in follicular development in primates. *Sci Rep*, 8, 6166.
20. ESPINOZA, J. A., ALVARADO, W., VENEGAS, B., DOMÍNGUEZ, R. & MORALES-LEDESMA, L. 2018. Pharmacological sympathetic denervation prevents the development of polycystic ovarian syndrome in rats injected with estradiol valerate. *Reprod Biol Endocrinol*, 16, 86.
21. FANNING, R. A., SHEEHAN, F., LEYDEN, C., DUFFY, N., IGLESIAS-MARTINEZ, L. F., CAREY, M. F., CAMPION, D. P. & O'CONNOR, J. J. 2017. A Role for Adrenergic Receptors in the Uterotonic Effects of Ergometrine in Isolated Human Term Nonlaboring Myometrium. *Anesth Analg*, 124, 1581-1588.
22. FERRUZ, J., BARRIA, A., GALLEGUILLOS, X. & LARA, H. E. 1991. Release of norepinephrine from the rat ovary: local modulation of gonadotropins. *Biol Reprod*, 45, 592-7.
23. FOX, S. R., HARLAN, R. E., SHIVERS, B. D. & PFAFF, D. W. 1990. Chemical characterization of neuroendocrine targets for progesterone in the female rat brain and pituitary. *Neuroendocrinology*, 51, 276-83.
24. FRITZ, S., FÖHR, K. J., BODDIEN, S., BERG, U., BRUCKER, C. & MAYERHOFER, A. 1999. Functional and molecular characterization of a muscarinic receptor type and evidence for expression of choline-acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter in human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 84, 1744-50.
25. GERENDAI, I., KOCSIS, K. & HALÁSZ, B. 2002. Supraspinal connections of the ovary: structural and functional aspects. *Microsc Res Tech*, 59, 474-83.
26. GOLDMAN, J. M., MURR, A. S. & COOPER, R. L. 2007. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 80, 84-97.
27. HAVELOCK, J. C., RAINEY, W. E. & CARR, B. R. 2004. Ovarian granulosa cell lines. *Mol Cell Endocrinol*, 228, 67-78.

28. HEIDER, U., PEDAL, I. & SPANEL-BOROWSKI, K. 2001. Increase in nerve fibers and loss of mast cells in polycystic and postmenopausal ovaries. *Fertil Steril*, 75, 1141-7.
29. IMPERATO, A., PUGLISI-ALLEGRA, S., CASOLINI, P. & ANGELUCCI, L. 1991. Changes in brain dopamine and acetylcholine release during and following stress are independent of the pituitary-adrenocortical axis. *Brain Res*, 538, 111-7.
30. KAUFER, D., FRIEDMAN, A., SEIDMAN, S. & SOREQ, H. 1998. Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature*, 393, 373-7.
31. KORNYA, L., BÓDIS, J., KOPPÁN, M., TINNEBERG, H. R. & TÖRÖK, A. 2001. Modulatory effect of acetylcholine on gonadotropin-stimulated human granulosa cell steroid secretion. *Gynecol Obstet Invest*, 52, 104-7.
32. LARA, H. E., DISSEN, G. A., LEYTON, V., PAREDES, A., FUENZALIDA, H., FIEDLER, J. L. & OJEDA, S. R. 2000. An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology*, 141, 1059-72.
33. LARA, H. E., DORFMAN, M., VENEGAS, M., LUZA, S. M., LUNA, S. L., MAYERHOFER, A., GUIMARAES, M. A., ROSA E SILVA, A. A. & RAMÍREZ, V. D. 2002. Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary during a normal estrous cycle and in polycystic ovary syndrome: Studies on norepinephrine release. *Microsc Res Tech*, 59, 495-502.
34. LARA, H. E., PORCILE, A., ESPINOZA, J., ROMERO, C., LUZA, S. M., FUHRER, J., MIRANDA, C. & ROBLERO, L. 2001. Release of norepinephrine from human ovary: coupling to steroidogenic response. *Endocrine*, 15, 187-92.
35. LIANG, Y. Q. & TANG, X. C. 2006. Comparative studies of huperzine A, donepezil, and rivastigmine on brain acetylcholine, dopamine, norepinephrine, and 5-hydroxytryptamine levels in freely-moving rats. *Acta Pharmacol Sin*, 27, 1127-36.
36. LONG, Q., LIU, X., QI, Q. & GUO, S. W. 2016. Chronic stress accelerates the development of endometriosis in mouse through adrenergic receptor  $\beta$ 2. *Hum Reprod*, 31, 2506-2519.
37. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-75.
38. LUNA, S. L., NEUMAN, S., AGUILERA, J., BROWN, D. I. & LARA, H. E. 2012. In vivo  $\beta$ -adrenergic blockade by propranolol prevents isoproterenol-induced polycystic ovary in adult rats. *Horm Metab Res*, 44, 676-81.
39. MANNI, L., CAJANDER, S., LUNDEBERG, T., NAYLOR, A. S., ALOE, L., HOLMÄNG, A., JONSDOTTIR, I. H. & STENER-VICTORIN, E. 2005. Effect of exercise on ovarian morphology and expression of nerve growth factor and alpha(1)- and beta(2)-adrenergic receptors in rats with steroid-induced polycystic ovaries. *J Neuroendocrinol*, 17, 846-58.



40. MAYERHOFER, A., DIMITRIJEVIC, N. & KUNZ, L. 2003. The expression and biological role of the non-neuronal cholinergic system in the ovary. *Life Sci*, 72, 2039-45.
41. MAYERHOFER, A., DISSEN, G. A., COSTA, M. E. & OJEDA, S. R. 1997. A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology*, 138, 3320-9.
42. MAYERHOFER, A. & FRITZ, S. 2002. Ovarian acetylcholine and muscarinic receptors: hints of a novel intrinsic ovarian regulatory system. *Microsc Res Tech*, 59, 503-8.
43. MAYERHOFER, A. & KUNZ, L. 2006. Ion channels of primate ovarian endocrine cells: identification and functional significance. *Expert Rev Endocrinol Metab*, 1, 549-555.
44. MAYERHOFER, A., KUNZ, L., KRIEGER, A., PROSKOCIL, B., SPINDEL, E., AMSTERDAM, A., DISSEN, G. A., OJEDA, S. R. & WESSLER, I. 2006. FSH regulates acetylcholine production by ovarian granulosa cells. *Reprod Biol Endocrinol*, 4, 37.
45. MCGEE, E. A. & HSUEH, A. J. 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev*, 21, 200-14.
46. MEINEL, S., BLOHBERGER, J., BERG, D., BERG, U., DISSEN, G. A., OJEDA, S. R. & MAYERHOFER, A. 2015. Pro-nerve growth factor in the ovary and human granulosa cells. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 24, 91-9.
47. MORALES-LEDESMA, L., RAMÍREZ, D. A., VIEYRA, E., TRUJILLO, A., CHAVIRA, R., CÁRDENAS, M. & DOMÍNGUEZ, R. 2011. Effects of acute unilateral ovariectomy to pre-pubertal rats on steroid hormones secretion and compensatory ovarian responses. *Reprod Biol Endocrinol*, 9, 41.
48. OJEDA, S. R., 2012. 2012. Female reproductive function. In: KOVACS, W. J. (ed.) sixth ed. Oxford University Press, New York ed.: Textbook of Endocrine Physiology.
49. PACAK, K., PALKOVITS, M., YADID, G., KVETNANSKY, R., KOPIN, I. J. & GOLDSTEIN, D. S. 1998. Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am J Physiol*, 275, R1247-55.
50. PARK, E., COCKREM, J. F., HAN, K. H., KIM, D. H., JUNG, M. H. & CHU, J. P. 2012. Stress-induced activation of ovarian heat shock protein 90 in a rat model of polycystic ovary syndrome. *J Obstet Gynaecol Res*, 38, 396-407.
51. PASTELÍN, C. F., ROSAS, N. H., MORALES-LEDESMA, L., LINARES, R., DOMÍNGUEZ, R. & MORÁN, C. 2017. Anatomical organization and neural pathways of the ovarian plexus nerve in rats. *J Ovarian Res*, 10, 18.
52. PIQUER, B., FONSECA, J. L. & LARA, H. E. 2017. Gestational stress, placental norepinephrine transporter and offspring fertility. *Reproduction*, 153, 147-155.
53. RODRIGUES, D. & ROWLAND, A. 2019. From Endogenous Compounds as Biomarkers to Plasma-Derived Nanovesicles as Liquid Biopsy; Has the Golden Age of Translational Pharmacokinetics-Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion-Drug-Drug Interaction Science Finally Arrived? *Clin Pharmacol Ther*, 105, 1407-1420.

54. ROSAS, G., LINARES, R., RAMÍREZ, D. A., VIEYRA, E., TRUJILLO, A., DOMÍNGUEZ, R. & MORALES-LEDESMA, L. 2018. The Neural Signals of the Superior Ovarian Nerve Modulate in an Asymmetric Way the Ovarian Steroidogenic Response to the Vasoactive Intestinal Peptide. *Front Physiol*, 9, 1142.
55. SOREQ, H. & SEIDMAN, S. 2001. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci*, 2, 294-302.
56. SQUICCIARINI, V., RIQUELME, R., WILSTERMAN, K., BENTLEY, G. E. & LARA, H. E. 2018. Role of RFRP-3 in the development of cold stress-induced polycystic ovary phenotype in rats. *J Endocrinol*, 239, 81–91.
57. STAHL, S. M. 2000. The new cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease, Part 1: their similarities are different. *J Clin Psychiatry*, 61, 710-1.
58. SVERRISDÓTTIR, Y. B., MOGREN, T., KATAOKA, J., JANSON, P. O. & STENER-VICTORIN, E. 2008. Is polycystic ovary syndrome associated with high sympathetic nerve activity and size at birth? *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294, E576-81.
59. SÁNCHEZ-CRIADO, J. E., TÉBAR, M., SÁNCHEZ, A. & GAYTÁN, F. 1993. Evidence that androgens are involved in atresia and anovulation induced by antiprogestosterone RU486 in rats. *J Reprod Fertil*, 99, 173-9.
60. TRKULJA, V., CRLJEN-MANESTAR, V., BANFIC, H. & LACKOVIC, Z. 2004. Involvement of the peripheral cholinergic muscarinic system in the compensatory ovarian hypertrophy in the rat. *Exp Biol Med (Maywood)*, 229, 793-805.
61. UCHIDA, S. 2015. Sympathetic regulation of estradiol secretion from the ovary. *Auton Neurosci*, 187, 27-35.
62. UCHIDA, S. & KAGITANI, F. 2015. Autonomic nervous regulation of ovarian function by noxious somatic afferent stimulation. *J Physiol Sci*, 65, 1-9.
63. ULUS, I. H. & WURTMAN, R. J. 1979. Selective response of rat peripheral sympathetic nervous system to various stimuli. *J Physiol*, 293, 513-23.
64. URRÁ, J., BLOHBERGER, J., TISZAVARI, M., MAYERHOFER, A. & LARA, H. E. 2016. In vivo blockade of acetylcholinesterase increases intraovarian acetylcholine and enhances follicular development and fertility in the rat. *Sci Rep*, 6, 30129.
65. WANG, L. Z., SYN, N., LI, S., BARATHI, V. A., TONG, L., NEO, J., BEUERMAN, R. W. & ZHOU, L. 2019. The penetration and distribution of topical atropine in animal ocular tissues. *Acta Ophthalmol*, 97, e238-e247.
66. WANG, R., YAN, H. & TANG, X. C. 2006. Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine. *Acta Pharmacol Sin*, 27, 1-26.
67. WOJTKIEWICZ, J., JANA, B., KOZŁOWSKA, A., CRAYTON, R., MAJEWSKI, M., ZALECKI, M., BARANOWSKI, W. & RADZISZEWSKI, P. 2014. Innervation pattern of polycystic ovaries in the women. *J Chem Neuroanat*, 61-62, 147-52.
68. ZANGENEH, F. Z., ABDOLLAHI, A., TAVASSOLI, P. & NAGHIZADEH, M. M. 2011. The effect of cold stress on polycystic ovary syndrome in rat: before and during modeling. *Arch Gynecol Obstet*, 284, 651-7.
69. ZAR, J. 1984. Biostatistical Analysis. 2 ed ed. Englewood Cliffs.

70. ZHU, X. D., CUADRA, G., BRUFANI, M., MAGGI, T., PAGELLA, P. G., WILLIAMS, E. & GIACOBINI, E. 1996. Effects of MF-268, a new cholinesterase inhibitor, on acetylcholine and biogenic amines in rat cortex. *J Neurosci Res*, 43, 120-6.