

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**EFFECTO DE LA ACTIVACIÓN β -ADRENÉRGICA EN
OVARIO DE RATA DURANTE EL PERIODO DE
SUBFERTILIDAD**

CAROLINA ALEJANDRA VEGA VILLARROEL

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
MÉDICAS MENCIÓN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN**

Director de Tesis: Dr. Alfonso Paredes Vargas

2015

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magíster presentada por la candidata

CAROLINA ALEJANDRA VEGA VILLARROEL

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Magister en Ciencias Biológicas** con **mención Biología de la Reproducción** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 26 de Enero de 2015.

Prof. Dr. Alfonso Paredes Vargas
Director de Tesis

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Enrique Castellón Vera

Prof. Dr. Armando Cortínez Castro

Prof. Dra. María Cecilia Johnson Pena
Presidente Comisión

Dedicatoria

Esta tesis está dedicada al Sr. Francisco Cortes Bonilla

Q.E.P.D

Agradecimientos

Para poder realizar ésta tesis de la mejor manera posible fue necesario del apoyo de muchas personas a las cuales quiero agradecer.

En primer lugar al Prof. Dr. Jorge Gamonal, Decano de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile, por su apoyo incondicional durante la realización de este trabajo y por permitir compatibilizar los estudios con el proyecto Mecesup. Y también agradecer al Prof. Dr. Juan Cortés Araya.

A mi tutor de tesis Prof. Dr. Alfonso Paredes, más que profesor un gran amigo, gracias por su constante ayuda, conocimientos y dejar este trabajo lo más perfecto posible. Gracias por sus consejos y apoyo durante tiempos difíciles, gracias y mil gracias por su paciencia.

Al Prof. Dr. Hernán Lara por sus sabios consejos y amistad.

A la comisión Dra. María Cecilia Johnson, Dr. Armando Cortínez, Dr. Enrique Castellón y Dra. Margarita Vega gracias por sus sugerencias, correcciones y consejos durante todo el desarrollo de este trabajo.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a mis compañeros y amigos del Laboratorio de Neurobioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas: Daniela Fernandois, Michelle Tizsavari, Gonzalo Cruz, Jonathan Martínez, Rafael Barra, Beatriz Piquer, Monika Greiner por todos sus consejos y amistad.

A mis compañeros y amigos del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas gracias Fernanda Schaüfler, Freddy Ruz y Elsa Carrasco.

A mis compañeros y amigos del 4to piso de la Facultad de Odontología (Decanato, DEA, Oficina de Personal, Abastecimiento, Recursos Humanos y Tesorería).

A Iliia Silva de la Biblioteca de la Facultad de Odontología por la entrega de papers y su infinita amistad.

A mi jefe Dr. Mauricio Budini, por su ayuda durante este año, gracias por la confianza y amistad entregada.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia, en especial de mi querida madre María Magdalena, mi pololo Guillermo y mis dos hermanos Leo y José Tomás, gracias por ser partícipes de este gran logro.

A todos ellos, muchas gracias.

Financiamiento

Esta tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT 1120147

Presentación en Congresos

Agosto 2013, “Kisspeptin in the ovary is regulated by beta adrenergic receptor during the ovarian reproductive ageing”. International Workshop in Neuroendocrinology. Santa Clara Eco Resort, Dourado, Brazil.

Julio 2013, “Blocking of Beta-Adrenergic Receptor at the Subfertility Period Inhibits of Kisspeptin mRNA in the Rat Ovary”. SSR 46th Annual Meeting. Reproductive Health: nano to Global Program. Montreal, Quebec, Canadá.

Septiembre 2012, “Efecto de la activación β -adrenérgica en ovario de rata durante el periodo de subfertilidad”. XXIII Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo. Viña del Mar, Chile.

Índice

	Página
Índice.....	8
Tabla de figuras.....	10
Abreviaciones.....	12
Resumen.....	14
Abstract.....	16
1. Introducción.....	18
1.1. Función ovárica.....	18
1.2. Senescencia reproductiva.....	21
1.3. Sistema Nervioso simpático en la función ovárica.....	24
1.4. Actividad simpática durante el envejecimiento ovárico.....	25
1.5. Modelo experimental: rata Sprague Dawley.....	26
1.6. En síntesis.....	27
2. Hipótesis.....	29
3. Objetivo general.....	29
4. Objetivos específicos.....	29
5. Material y Métodos.....	30
5.1. Ciclicidad estral.....	31
5.2. Determinación de Hormona Esteroidales.....	32
5.3. Determinación de la Hormona Antimülleriana.....	34
5.4. Análisis morfológico del ovario.....	34
5.5. Homogenización de las muestras de ovario.....	36
5.6. Determinación de NA y de MHPG en ovario.....	37
5.7. Determinación de la concentración de receptores β -adrenérgicos.....	37
5.8. Isoproterenol.....	39
5.9. Análisis estadístico.....	39

	Página
6. Resultados.....	40
6.1. Objetivo 1.....	40
a. Estructuras foliculares totales.....	40
b. Folículos preantrales totales.....	41
c. Folículos antrales totales.....	42
d. Folículos preantrales.....	43
d.1 Folículos primordiales totales, saludables y atrésicos.....	43
d.2 Folículos primarios totales, saludables y atrésicos.....	44
d.3 Folículos secundarios totales, saludables y atrésicos.....	45
e. Folículos antrales.....	46
e.1 Folículos antrales saludables y atrésicos.....	46
f. Estructuras quísticas.....	47
6.2. Objetivo 2.....	48
a. Ciclicidad estral en ratas tratadas con ISO.....	48
b. Niveles de las hormonas esteroidales plasmáticas.....	52
c. Niveles de la hormona peptídica AMH.....	54
6.3. Objetivo 3.....	56
a. Concentración de los receptores β -adrenérgicos.....	56
b. Concentración de NA y su metabolito MHPG ovárico.....	57
7. Discusión.....	60
8. Modelos propuestos.....	72
9. Conclusión.....	74
10. Proyección.....	75
11. Bibliografía.....	76

Tabla de figuras

		Página
Figura 1	Foliculogénesis: clasificación de los folículos ováricos durante su crecimiento y desarrollo.....	20
Figura 2	Representación esquemática del número de folículos primordiales presentes en el ovario y la calidad cromosomal de ovocitos en relación a la edad femenina y correspondiente a los eventos reproductivos.....	22
Figura 3	Esquema del método utilizado.....	31
Figura 4	Ciclo estral en ratas.....	32
Figura 5	Esteroidogénesis en células de la granulosa y de la teca en folículos antrales.....	33
Figura 6	Microfotografías de la foliculogénesis y vías de desarrollo de estructuras anómalas como folículos tipo III, prequiste y quiste...	36
Figura 7	Cantidad de estructuras foliculares totales.....	40
Figura 8	Folículos preantrales totales.....	41
Figura 9	Folículos antrales totales.....	42
Figura 10	Folículos primordiales totales, folículos primordiales saludables y folículos primordiales atrésicos.....	43
Figura 11	Folículos primarios totales, folículos primarios saludables y folículos primarios atrésicos.....	44
Figura 12	Folículos secundarios totales, folículos secundarios saludables y folículos secundarios atrésicos.....	45
Figura 13	Folículos antrales saludables y folículos antrales atrésicos.....	46
Figura 14	Estructuras quísticas: folículos tipo III, prequistes y quistes.....	47
Figura 15	Gráficos representativos de la ciclicidad estral.....	49

	Página
Figura 16 Porcentaje de ciclicidad.....	51
Figura 17 Porcentaje de permanencia en las diferentes etapas del ciclo estral.....	51
Figura 18 Concentración plasmática de hormonas esteroidales.....	53
Figura 19 Cuerpos lúteos y folículos luteinizados.....	54
Figura 20 Niveles plasmáticos de la hormona peptídica AMH.....	55
Figura 21 Concentración de receptores β -adrenérgicos.....	56
Figura 22 Concentración de NA ovárico.....	58
Figura 23 Concentración de MHPG ovárico.....	59
Figura 24 Razón MHPG/NA ovárica.....	59
Figura 25 Porcentaje de reclutamiento.....	64
Figura 26 Comparación del ciclo estral de la rata (a) y el ciclo menstrual de la mujer (b).....	65
Figura 27 Tamaños de cuerpos lúteos en ratas de 10 meses de edad.....	67
Figura 28 Niveles plasmáticos de la LH.....	68
Figura 29 Modelo: Ratas de 6 meses de edad, tratadas con ISO.....	72
Figura 30 Modelo: Ratas de 10 meses de edad, tratadas con ISO.....	73

Abreviaciones

A	:	Androstenediona
AMH	:	Hormona Anti-Mülleriana
CG	:	Células de la granulosa
COMT	:	Catecol-o-metil transferasa
CT	:	Células de la teca
CTE	:	Células de la teca externa
CTI	:	Células de la teca interna
CL	:	Cuerpo lúteo
DPBS	:	Buffer fosfato salino de Dulbecco
E	:	Estradiol
ELISA	:	Ensayo por inmuno absorción ligado a una enzima
FSH	:	Hormona folículo estimulante
GnRH	:	Hormona liberadora de gonadotrofinas
hCG	:	Gonadotrofina coriónica
HPLC	:	Cromatografía líquida de alto rendimiento
ISO	:	Isoproterenol
LH	:	Hormona luteinizante
LHR	:	Receptor de la hormona luteinizante
MAO	:	Monoamino oxidasa
MHPG	:	3-metoxi-4-hidroxifenilglicol
NA	:	Noradrenalina
NGF	:	Factor de crecimiento nervioso
NOS	:	Nervio ovárico superior
P	:	Progesterona

PNO : Plexo nervioso ovárico
PCO : Ovario poliquístico
SNS : Sistema nervioso simpático
SOP : Síndrome ovario poliquístico
VE : Valerato de estradiol

Resumen

La postergación de la maternidad hacia el periodo de subfertilidad es un tema de salud pública relevante, los mecanismos que operan en esta etapa reproductiva no han sido descritos. Evidencias de nuestro laboratorio, obtenidas en ratas Sprague Dawley, indican que la actividad nerviosa simpática aumenta espontáneamente durante el periodo de subfertilidad, lo que conduce a la formación y/o mantención de quistes foliculares, contribuyendo al cese de la función ovárica. El aumento del tono adrenérgico en ovario de rata durante el periodo óptimo de fertilidad (3-7 meses de edad) altera el desarrollo folicular y podría conducir a la formación y mantención de quistes foliculares, lo que podría acelerar el envejecimiento reproductivo. Para estudiar esta posibilidad, se postula la hipótesis que la “La activación β -adrenérgica inducida por la administración de Isoproterenol produce un adelanto del envejecimiento ovárico de la rata durante el periodo de subfertilidad”. Para desarrollar esta hipótesis se plantea el *objetivo general*: Estudiar el efecto del aumento de la actividad β -adrenérgica en el desarrollo folicular ovárico de rata durante el período de fertilidad y subfertilidad. Para ello, se utilizaron ratas Sprague Dawley de 6, 8 y 10 meses de edad. Se simuló un tono adrenérgico aumentado mediante la administración vía subcutánea de Isoproterenol, un agonista β -adrenérgico. Los animales fueron eutanasiados a los 20 días post-inyección; los ovarios izquierdos fueron fijados en bouins y teñidos con hematoxilina-eosina para el análisis morfológico, se colectó suero para la determinación de las hormonas esteroidales y Antimülleriana por enzimo inmuno ensayo. La noradrenalina y el 3-

metoxi-4-hidroxifenilglicol se midieron por cromatografía líquida de alto rendimiento. En animales controles que ingresan a la etapa de subfertilidad, se observó una disminución en el contenido de hormonas esteroidales séricas (progesterona, androstenediona, y estradiol), hormona antimülleriana, y ciclos estrales. El análisis morfológico mostró en este grupo de animales, un aumento de las estructuras atrésicas y quísticas, indicando el deterioro de la función ovárica en esta etapa. La administración de Isoproterenol para activar la vía β -adrenérgica en ratas tuvo diferentes efectos dependiendo del periodo reproductivo. En ratas fértiles de 6 meses de edad se observó un aumento en la atresia de folículos preantrales, antrales, y folículos tipo III. Estos resultados coinciden con una disminución de las hormonas esteroidales como progesterona, androstenediona y estradiol, y número de cuerpos lúteos. Durante el inicio del periodo de subfertilidad en ratas de 8 meses de edad no fue posible observar cambios significativos inducidos por la activación β -adrenérgicas. Mientras que en ratas en periodo sub-fértil de 10 meses de edad, se observó que un aumento de folículos secundarios sanos, aumento de los niveles séricos de las hormonas anti-Mülleriana y androstenediona, aumento en la cantidad de folículos tipo III. Sin embargo, se observó una menor cantidad de quistes foliculares y un aumento en la cantidad de cuerpos lúteos. En conclusión, el presente trabajo sugiere que la sobre-estimulación β -adrenérgica afecta la función ovárica, sugiriendo un adelanto del envejecimiento ovárico en ratas fértiles y contrario a lo propuesto, se observó un grado de mejoramiento de la función ovárica en ratas en periodo sub-fértil, ambos resultados apoyan la idea que el SNS tiene un rol importante en la función ovárica.

Abstract

The postponement of motherhood to the period of subfertility is an important public health theme; the mechanisms involved in this reproductive period have not been described. Evidence from our laboratory, obtained in Sprague Dawley rats indicate that sympathetic nerve activity increases spontaneously during the period of subfertility, facilitating the formation and / or maintenance of follicular cysts, contributing to the cessation of ovarian function. The increased adrenergic tone in rat ovary during the optimum period of fertility (3-7 months old) alters follicular development and could allow the formation and maintenance of follicular cysts and could accelerate reproductive aging. To study this possibility, the hypothesis postulated is "The β -adrenergic activation by Isoproterenol produced an acceleration of rat ovarian aging during the subfertility period." To test this hypothesis, the following objective was proposed: To study the effect of increased β -adrenergic activity on rat ovarian follicular development during the fertility and subfertility period. For this, Sprague-Dawley rats of 6, 8 and 10 months old were used. In our animals' model, Adrenergic tone enhanced was simulated by Isoproterenol administration, a β -adrenergic agonist. Animals were euthanized at 20 days post-injection; To morphological analysis, the left ovaries were fixed in Bouins and stained with hematoxylin-eosin. To determinate steroid and anti-Müllerian hormone by enzyme immunoassay, of serum was collected. Noradrenaline and 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol was measured by high performance liquid chromatography.

In control animals that initiate the stage of subfertility, it was observed a decrease in both, the serum steroid hormones (progesterone, androstenedione, and estradiol), and AMH content, accompanied of estrous cyclicity loss. The morphological analysis showed an increased in atretic and cystic structures, suggesting impairment of ovarian function at this stage. Isoproterenol administration to activate the β -adrenergic pathway in rats had different effects depending on the reproductive period. In 6 months old rats was observed an increase in both preantral and antral follicular atresia, and also an increase number of type-III follicles. In this animal group, the result showed a decreased in steroid hormones such as progesterone, androstenedione and estradiol, and number of corpora lutea. In rats 8 months old was not possible to observe significant changes. While that 10 months old rat was observed an increased secondary follicles number, serum levels of the AMH and androstenedione hormones, also presented an increased amount of type-III follicles. However, a smaller amount of follicular cysts and an increase in the number of corpora lutea was observed. In conclusion, the present work suggests that overstimulation β -adrenergic affects ovarian function, suggesting an accelerate of ovarian aging in fertile period and contrary to thought, a degree of improvement of ovarian function in rats in subfertile period was observed, both results support the idea that the sympathetic nerves system has an important role in ovarian function.

1. Introducción

1.1 Función Ovárica

La principal función de la gónada femenina es el desarrollo, maduración y liberación de uno o varios ovocitos maduros para su posterior fertilización y así dar continuidad a las diferentes especies (Mcgee y Hsueh, 2000). El ovario está bajo el control endocrino, regulado por el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada: el hipotálamo secreta en forma pulsátil GnRH (Guyton y Hall, 1997), estimulando a la hipófisis a secretar gonadotrofinas como la hormona folículo estimulante (FSH), responsable del reclutamiento y crecimiento folicular y de la síntesis de estrógenos, y la hormona luteinizante (LH), responsable de la ovulación y formación de los cuerpos lúteos (Mcgee y Hsueh, 2000).

El desarrollo folicular comienza con el ensamblaje folicular, donde los ovocitos se rodean de las células precursoras de la granulosa y se selecciona un ovocito desde los “nidos de ovocitos”, formando así los *folículos primordiales*. Posteriormente, estas células se diferencian hacia células de granulosa (CG), que proliferan hasta formar una capa de células cuboidales que circundarán totalmente el ovocito, formando el *folículo primario*. Ocurrido esto, las CG comienzan a proliferar dando origen a 2 o más capas celulares, lo que permite que células mesenquimales se adhieran a la periferia y den forma a la membrana basal, siendo éstas las primeras precursoras de

las células tecaes (CT), que darán origen en conjunto, al *folículo secundario*. El folículo secundario es de vital importancia en la maduración folicular, ya que en esta etapa las CG comienzan a adquirir los receptores de FSH, lo que hace al folículo desde este punto, dependientes de gonodatrofinas (Mcgee y Hsueh, 2000). Al final del estado secundario, ocurre una migración de células mesenquimáticas desde el estroma ovárico dando origen a las células de la teca interna (CTI) como externa (CTE), iniciándose la formación de *folículo terciario*. Coincidente con la adquisición de las células tecaes, el folículo terciario inicia la formación del antro, el cual comienza con la acumulación de fluido folicular entre las CG. El fluido folicular está formado por productos de secreción de las CG y transudado de los capilares sanguíneos que irrigan a las CT. Es en esta etapa del desarrollo que los folículos adquieren una gran capacidad para sintetizar andrógenos, específicamente a nivel de las CTI, bajo el estímulo de LH. Esto es posible, ya que en esta etapa de la foliculogénesis se expresan receptor a LH (LHR) en dichas células. Por otro lado, el folículo se hace sensible a la acción de la FSH, cuyos receptores se expresan en las CG y su transducción de señal está acoplada a la proteína Gs (estimuladora) con el consiguiente aumento de los niveles del segundo mensajero AMP cíclico. Esto trae consigo la activación de la proteína quinasa A (PKA), la cual fosforila secuencialmente diversos sustratos, activando procesos celulares, lo que también ocurre en las CT por la acción de LH. En el caso de las CG uno de los sustratos es la enzima citocromo P450 aromatasa, encargada de transformar andrógenos en estrógenos, y frente al aporte creciente de andrógenos a la CG, la aromatasa aumenta su actividad inducida por FSH, así como, su expresión, incrementando

gradualmente la producción de 17β -estradiol, lo que se refleja a nivel periférico (Vantman y Vega, 2010) (figura 1).

La etapa final del desarrollo folicular es la formación del *corpo lúteo*, que producirá principalmente progesterona, aunque puede sintetizar también andrógenos y estrógenos. Este cuerpo lúteo se considerará funcional mientras la producción de progesterona se mantenga constante, lo que variará de acuerdo a cada especie. La disminución de la esteroidogénesis promoverá la regresión lútea, a menos que la presencia de la hCG de origen placentario pueda mantener al cuerpo lúteo (Greenwald y Roy, 1994).

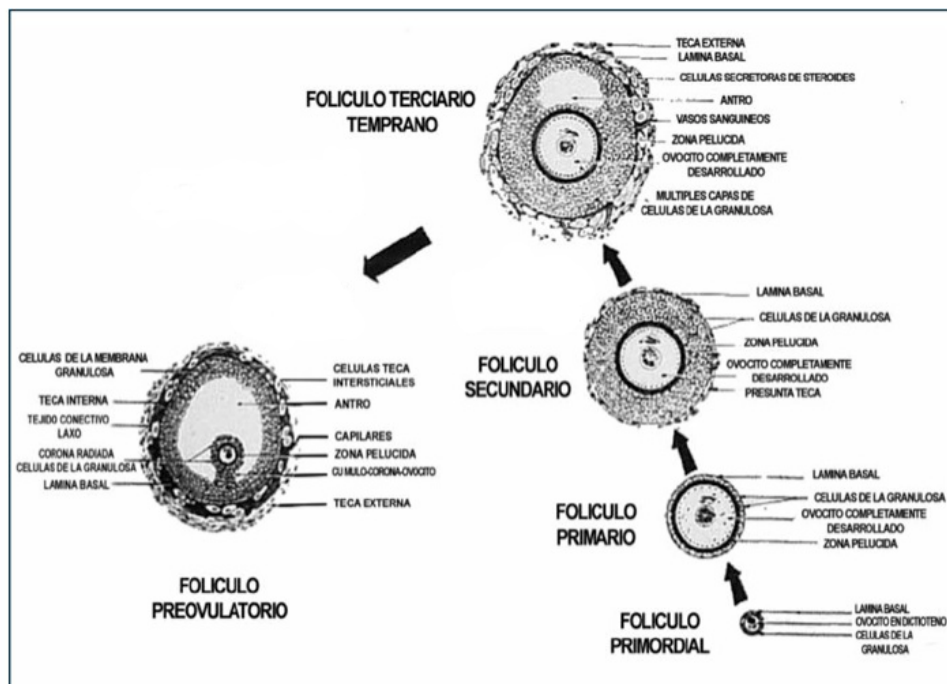


Figura 1. Foliculogénesis: clasificación de los folículos ováricos durante su crecimiento y desarrollo (Vantman y Vega, 2010).

Durante la vida el pool de ovocitos se determina tempranamente. Por lo tanto, la senescencia ovárica está vinculada a la disminución y eventual agotamiento de la reserva de los folículos primordiales (Mcgee y Hsueh, 2000).

1.2. Senescencia reproductiva

La senescencia reproductiva o envejecimiento del ovario se asocia con una disminución de la fertilidad (Swanton y Child, 2005) y marca el inicio de la transición hacia la menopausia en la mujer (Broekmans y cols., 2009). La tasa de fertilidad disminuye gradualmente a partir de los 32 años de edad (Swanton y Child, 2005). Edad en la cual las mujeres comienzan a ser madres por primera vez, ya que postergan su maternidad a cambio de una mejor educación, estabilidad e independencia económica (Nugent y cols., 2012). La edad de la mujer es un factor determinante en el pronóstico de infertilidad (Broekmans y cols., 2007), debido a que con la edad hay una menor disponibilidad de ovocitos y la calidad de los que sobreviven no es buena, aumentando la probabilidad de enfermedades genéticas (Cheung y cols., 2011).

La senescencia reproductiva en la mujer se acelera a los 37 años de edad debido a una mayor pérdida de folículos. A esta edad hay menos de 10.000 folículos en el ovario) (figura 2) y los que quedan son de menor calidad. A partir de este período se observa un acortamiento constante del ciclo menstrual (debido a una fase folicular más corta), un incremento leve pero significativo de la concentración basal de la FSH

y una disminución de los niveles de inhibina (A y B) (Cheung y cols., 2011), efectos que se reflejan en un crecimiento folicular acelerado y agotamiento de la reserva folicular (Broekmans y cols., 2007). Por otro lado, la característica de la senescencia reproductiva de las hormonas inhibina B y AMH disminuyen en la senescencia, por esta razón tanto la FSH, inhibina B y AMH se utilizan como marcadores de senescencia reproductiva (de Vet y cols., 2002).

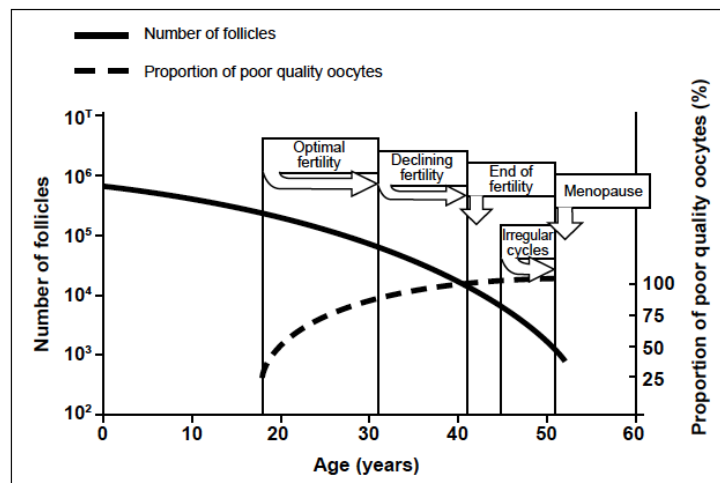


Figura 2. Representación esquemática del número de folículos primordiales presentes en el ovario y la calidad cromosomal de ovocitos en relación a la edad femenina y correspondiente a los eventos reproductivos (Cheung y cols., 2011).

La AMH, fue inicialmente estudiada en el desarrollo fetal masculino durante la diferenciación sexual para promover la regresión de los Conductos Millerianos (Pellatt y cols., 2010). En ovario está presente y es producida por las células de la granulosa, desde las 36 semanas de gestación hasta la menopausia, expresándose en los folículos preantrales y folículos antrales pequeños (Swanton y Child, 2005). La

producción de AMH disminuye gradualmente a medida que crecen los folículos, una vez que los folículos alcanzan un tamaño en el que son dominantes, la AMH no se secreta más. Su desaparición desde estos folículos más grandes parece ser un requisito importante para la selección del folículo dominante y la ovulación. Además, la AMH tiene un papel inhibitorio en el ovario, reduciendo el reclutamiento folicular (Pellatt y cols., 2010).

Otro fenómeno que ocurre durante la senescencia, son cambios en las hormonas esteroidales. Por ejemplo, los niveles de estrógenos disminuyen a medida que progresa el envejecimiento ovárico (Broekmans y cols., 2009), mientras que la concentración de progesterona se ve disminuida con la edad, lo cual tiene relación con la menor cantidad de cuerpos lúteos en el ovario (Cheung y cols., 2011).

En la actualidad no hay claridad de los distintos mecanismos del envejecimiento reproductivo femenino. Se sugiere que las alteraciones del control neuroendocrino de la función ovárica se debe al feedback negativo hormonal alterado, menor cantidad de folículos antrales, aumento de los niveles plasmáticos de la AMH, pérdida de la calidad de los ovocitos que se expresa por una incidencia cada vez mayor de embriones aneuploides. Debido a estos antecedentes, es necesario entender los mecanismos de desarrollo folicular durante el período de subfertilidad y envejecimiento ovárico. Estudios de nuestro laboratorio, han demostrado que el ovario también es regulado por el SNS, y que en la actualidad no existe mayor

información respecto a los mecanismos simpáticos involucrados en el envejecimiento ovárico.

1.3. Sistema Nervioso simpático en la función ovárica

El ovario también está regulado por la vía nerviosa que comienza en el hipotálamo, desde allí se proyectan neuronas que viajan por la médula espinal para salir y hacer relevo en el ganglio celiaco, lugar donde se ubica el soma de las neuronas simpáticas las cuales proyectan sus terminales nerviosos hacia el ovario (Gerendai y cols., 2002 y Dissen y cols., 2004). Estas fibras, las cuales contienen noradrenalina (NA), inervan diferentes componentes celulares del ovario como, vasos sanguíneos, tejido conectivo y folículos en las diferentes etapas de desarrollo (Ojeda y Skinner, 2006). La actividad de estas fibras nerviosas está acoplada al receptor β -adrenérgico, el cual está implicado en la secreción de andrógenos por las células tecales (Fernandois y cols., 2012), y la secreción de progesterona desde la granulosa y células lúteas (Ojeda y Skinner, 2006).

Los nervios que contienen NA alcanzan el ovario a través del nervio ovárico superior (NOS) que viaja junto al ligamento suspensorio, y por el plexo nervioso ovárico (PNO) que lo hace junto con la arteria ovárica (Ojeda y Skinner, 2006). Las catecolaminas presentan cambios en su concentración durante el ciclo estral normal, siendo su mayor expresión en la etapa del ciclo estral en diestro y mínima en estro (Lara y cols., 1993). El compromiso de la NA en la regulación del ovario, se ha

demostrado tanto a nivel esteroideogénico (principalmente secreción de progesterona) como foliculogénico. Las catecolaminas no influyen en la síntesis de estradiol, debido a que carecen de efecto directo en la actividad de la aromatasas; además facilitan el efecto estimulador de gonadotropinas en la secreción de esteroides de manera aditiva, sugiriendo que bajo circunstancias fisiológicas, los nervios simpáticos catecolaminérgicos contribuyen a amplificar los efectos de las gonadotropinas circulantes sobre la esteroideogénesis ovárica (Fernandois, 2011).

1.4. Actividad simpática durante el envejecimiento ovárico

Evidencias en la literatura sugieren que la senescencia reproductiva está asociada a una hiperactivación del sistema nervioso simpático del ovario. Mujeres postmenopáusicas presentan mayor cantidad de fibras nerviosas en el ovario (Heider y cols. 2001) y la mayor actividad simpática ha sido evidenciada por Sverrisdottir y cols. (2007). En ratas, dicha hiperactivación se relaciona con ciertos cambios morfológicos y neuroendocrinos en el ovario, por ejemplo, en ratas subfétil se ve caracterizada por un aumento de estructuras ováricas anómalas como quistes foliculares y folículos luteinizados. Aumenta la concentración de NA y hormonas androgénicas (Acuña y cols. 2009). Interesantemente, estas características también ocurren en ratas fétils cuando son sometidas a estrés por frío para activar el sistema simpático del ovario (Paredes y cols. 1998 y Dorfman y cols. 2003). Por otro lado, estudios previos en nuestro laboratorio, han demostrado que la administración de ISO un agonista β -adrenérgico en ratas jóvenes, conduce a la formación de

prequistes y quistes foliculares (Neumann, 1997 y Luna y cols. 2012). Dicha condición fue revertida al administrar un antagonista β -adrenérgico, como el Propanolol (Luna y cols. 2012, Fernandois 2012). Estos estudios concluyeron que la activación del receptor β -adrenérgico podría ser uno de los mecanismos responsables para la formación de quistes foliculares. Acuña y cols. (2009) demostraron que el contenido y liberación de catecolaminas en el ovario, aumentan progresivamente con la edad (desde 6 a 12 meses). Este aumento en el tono simpático del ovario se correlacionó con el aumento de estructuras quísticas, comparado con ratas de la misma edad (Acuña y cols., 2009). Considerando que las catecolaminas, como es el caso de la NA, ejercen su efecto a través de los receptores β -adrenérgicos, se postula que esta vía podría estar involucrada de manera relevante en la formación y mantención de las estructuras quísticas durante el período de subfertilidad. Sin embargo, los mecanismos acerca de cómo la vía de señalización β -adrenérgica podría influir en el proceso de sub-fertilidad son poco entendidos.

1.5. Modelo experimental: rata Sprague Dawley

La senescencia reproductiva ocurre en variadas especies de mamíferos, entre ellos los roedores se han utilizado como modelo animal para entender algunos aspectos de esta etapa que aún no es bien comprendida. En este trabajo se utilizará como modelo animal la cepa Sprague Dawley ya que es un mamífero fácil de manipular, su genética está estandarizada y su esperanza de vida es corta. Esta cepa tiene una

esperanza de vida de 2-3 años en cautiverio. El comienzo de la ovulación ocurre a los 32 +/- 1 días de vida, ya que se relaciona con la apertura vaginal (Cruz y cols., 2012), desde este momento los ciclos duran 4 días, es decir, cada 4 días existe una ovulación. Por ende, ya son capaces de tener en promedio 8 crías por camada, y un periodo de gestación de 21 días (Brann y Mahesh, 2005).

El periodo de fertilidad óptimo es entre los 4 y 7 meses de edad, a partir de los 8 meses de edad, las ratas comienzan un periodo de subfertilidad, en el cual el número de partos disminuye a la mitad hasta llegar a los 10 meses de edad, donde la función reproductiva está prácticamente disminuida (Acuña y cols., 2009). Se ha observado que en estos animales la senescencia reproductiva va acompañada de una disminución del número de folículos preovulatorios y consecuentemente una menor ovulación. Esto conllevaría a un aumento de la tasa de formación de quistes. Además, este modelo puede relacionarse con lo observado en el periodo de subfertilidad y menopáusicas en mujeres donde los ovarios presentan características fisiológicas similares a los observados en ratas (Acuña y cols., 2009; Chávez-Genaro y cols., 2007).

1.6. En síntesis: La postergación de la maternidad hacia el periodo de subfertilidad hace necesaria la búsqueda de métodos que amplíen y retrasen la ventana de subfertilidad en la mujer. La declinación de la fertilidad en la mujer coincide con una acelerada pérdida en la reserva folicular y un adelanto de la menopausia.

Paralelamente, en esta etapa también se ha observado un aumento en el número de fibras simpáticas que inervan el ovario, fenómeno que también se ha observado en estudios realizados en rata. Este incremento de fibras nerviosas podría causar un aumento en el contenido y la liberación de NA, lo que a su vez estaría relacionado con un aumento en el número de estructuras foliculares quísticas y prequísticas. Estos fenómenos son observados con el envejecimiento y se traducen en una pérdida de la reserva folicular, un aumento espontáneo del número de estructuras quísticas, y finalmente una pérdida de la fertilidad. Considerando que las catecolaminas, como es el caso de la NA, ejercen su efecto a través de los receptores β -adrenérgicos, se postula que esta vía podría estar involucrada de manera relevante en la formación y mantención de las estructuras quísticas durante el período de subfertilidad. Sin embargo, los mecanismos acerca de cómo la vía de señalización β -adrenérgica podría influir en el proceso de sub-fertilidad son poco entendidos. Por esta razón, en esta tesis se propone simular un tono adrenérgico aumentado, mediante la administración sistémica de un agonista β -adrenérgico como el Isoproterenol en ratas Sprague Dawley. De esta manera, se espera que la sobre-activación de la vía β -adrenérgica pueda inducir de forma prematura la formación de quistes ováricos de una manera similar a lo que sucede en la etapa de sub-fertilidad. Esto nos permitiría poder conocer con mayor detalle cómo el SNS podría estar involucrado en la regulación de este proceso.

Por los antecedentes presentados anteriormente se presentan la siguiente hipótesis.

2. Hipótesis

La activación β -adrenérgica inducida por la administración de Isoproterenol produce un adelanto del envejecimiento ovárico de la rata durante el periodo de subfertilidad.

3. Objetivo general

Determinar si la activación β -adrenérgica produce un cambio en el desarrollo folicular, favoreciendo la formación de quistes y la aceleración del envejecimiento ovárico durante el periodo de subfertilidad de la rata.

4. Objetivos específicos

1.- Mediante análisis morfológico determinar cambios histológicos en ovarios de ratas tratadas con isoproterenol, durante el periodo de fertilidad y subfertilidad.

2.- Determinar la ciclicidad estral, niveles de las hormonas esteroidales plasmáticas y niveles de la hormona peptídica AMH en ratas tratadas con isoproterenol, durante el periodo de fertilidad y subfertilidad.

3.- Determinar la concentración de receptores β -adrenérgicos, NA y su metabolito MHPG en ratas tratadas con isoproterenol, durante el periodo de fertilidad y subfertilidad.

5. Material y Métodos

Se utilizaron ratas *Sprague Dawley* de 6, 8 y 10 meses de edad, divididas en 2 grupos para cada edad, mantenidas en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, con 12/12 hrs. oscuridad-día con alimento y agua ad-libitum. Los experimentos fueron realizados bajo la Guía Internacional de Principios Biomédicos en la Investigación en Animales de la Society for the Study of Reproduction, y aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Cada grupo estaba conformado por 6 ratas. A cada grupo experimental se les administró subcutáneamente isoproterenol (ISO, Sigma Chemical Co, USA) a una concentración de 125 ug/kg /día/por 10 días (Figura 3). Como grupo control se tomaron 6 ratas a las cuales se les administró diariamente por 10 días el vehículo (NaCl 0,9% con ácido ascórbico 0,1% (Merck Chemicals, Germany). A los 20 días post administración de ISO o vehículo los animales se eutanasiaron mediante decapitación con guillotina. Una vez obtenidas las muestras fueron mantenidas en el freezer -60°C. hasta su procesamiento. Excepto los ovarios izquierdos que fueron inmediatamente sumergidos en el fijador Bouin para los análisis morfológicos.

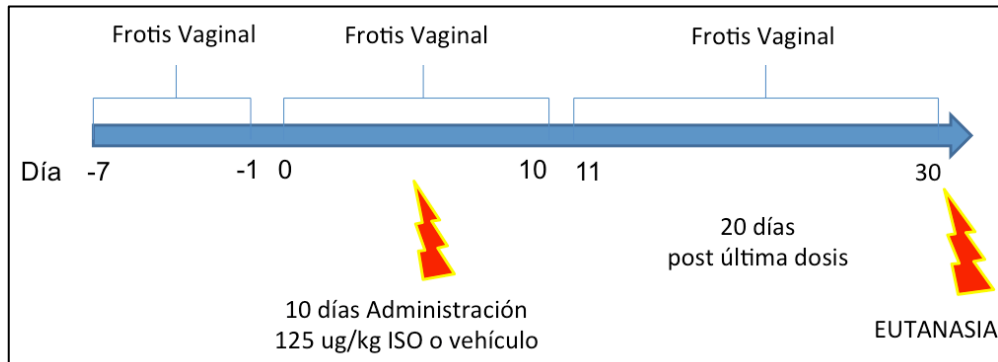


Figura 3. Esquema del método utilizado. Una semana antes de iniciar los tratamientos, a cada grupo de ratas de 6, 8 y 10 meses de edad, se les realizó frotis vaginal, posteriormente durante 10 días se les inyectó ISO o vehículo, y se esperaron 20 días para la eutanasia.

5.1. Ciclicidad estral.

Para determinar las variaciones del ciclo reproductivo de las ratas, se registró el ciclo estral mediante la visualización del flujo vaginal en un microscopio óptico durante todas las mañanas (entre 9 a 11 hrs.) desde una semana antes de la administración de ISO hasta el momento de la eutanasia.

El ciclo estral de la rata depende de los cambios hormonales de cada animal, y nos da un indicio del funcionamiento ovárico. Como se observa en la Figura 4, se consideró como un ciclo estral exitoso, según Marcondes y Cols. (2002) todos los pasos que siguieran la siguiente línea: Proestro, Estro, Diestro 1 y Diestro 2.

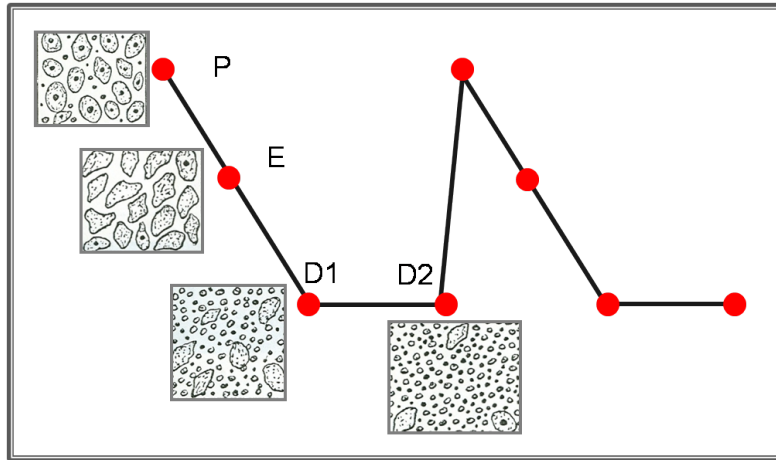


Figura 4. Ciclo estral en ratas. Grafica de citología de un frotis vaginal con ciclicidad estral normal en la rata. P, proestro; E, estro; D1, metaestro y D2, diestro (Marcondes y cols., 2002).

5.2. Determinación de Hormonas Esteroidales

Para determinar la función ovárica, se midieron los niveles de las hormonas esteroidales producidas por el ovario a nivel sérico. Como es sabido la ruta metabólica de hormonas esteroidales usa como sustrato de partida la progesterona para producir androstenediona, luego testosterona, y consecuentemente estradiol (Figura 5). Por lo que se midieron los niveles de algunas de las hormonas involucradas.

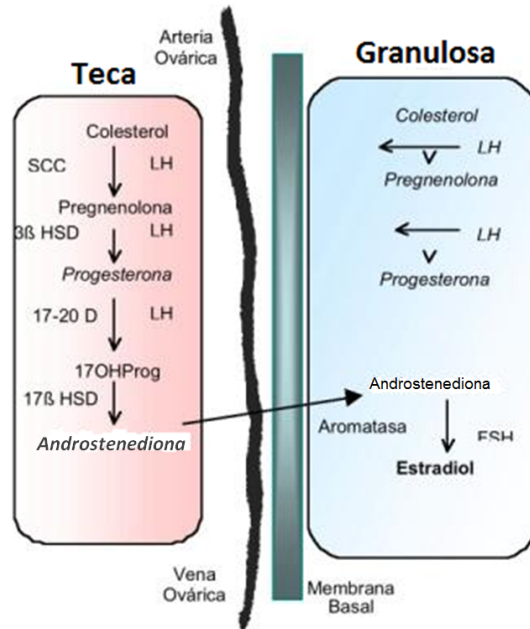


Figura 5. Esteroidogénesis en células de la granulosa y de la teca en folículos antrales. SCC = C20, 22 desmolasa dependiente de $\text{cyt P450}_{\text{SCC}}$. 3β HSD = 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa. 17-20 D = C17, 20 desmolasa dependiente de $\text{cyt P450}_{\text{C17}}$. 17β HSD = 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Velázquez y Mendieta, 2012).

Para la determinación de estas hormonas se utilizó el suero de total de 20 animales tratados con ISO y 19 animales controles. Para dicha medición se separó el plasma centrifugando a 3500 rpm por 5 minutos, y posteriormente se procedió a medir los niveles de androstenediona (A), estradiol (E) y progesterona (P) mediante diversos kits de inmunoensayo enzimático: ALPCO Immunoassay N° 11-ANRHU-E01 que posee una sensibilidad para A de 0,04 ng/ml y menos del 0.4%; ALPCO Immunoassay N° 11-ESTHU-E01 que posee una sensibilidad para E de 10 pg/mL y menos de 1,6% de reacciones cruzadas con otras hormonas; ALPCO Immunoassay N° 11-PROHU-E01 que posee una sensibilidad para P de 0,1 ng/ml y menos del 2%).

5.3. Determinación de la Hormona Anti-Mülleriana

Aunque la pérdida continua de la cantidad de folículos sólo será detectado en las últimas etapas del ciclo reproductivo, marcadores ecográficos y endocrinos han surgido en la última década para expresar con mayor exactitud la disminución del número de folículos. Por ejemplo, la hormona anti-Mülleriana (AMH), una glicoproteína dimérica producida exclusivamente por las células de la granulosa de los folículos preantrales (primarios y secundarios) y folículos antrales pequeños se ha utilizado como un marcador de la población folicular.

De acuerdo al protocolo del kit comercial “Rat anti-müllerian hormone (AMH) ELISA kit, de la compañía Cusabio, código CSB-E11162 cuya sensibilidad es de 0,375 ng/ml se realizó la medición de la hormona AMH en suero (Buyuk y cols., 2011).

5.4. Análisis morfológico del ovario.

Inmediatamente luego de eutanasiar las ratas, los ovarios izquierdos se fijaron en solución Bouin, luego se incluyeron en parafina. A continuación, todo el ovario fue cortado en secciones de 6 μm , las que fueron teñidas con hematoxilina-eosina. La identificación de las diferentes estructuras foliculares se basó según Cruz y cols. (2012) (Figura 6): **Los folículos primordiales** se caracterizaron por tener solo una capa de células de la granulosa aplanada alrededor del ovocito, mientras que los **folículos primarios** se diferenciaron de los anteriores porque sus células de la granulosa adquieren una forma cuboidal. Por otro lado, los **folículos secundarios** se caracterizaron por el aumento en el número de capas de células de la granulosa que

rodea al ovocito (igual o mayor a 2), por la presencia de células tecaes y por su facilidad de distinguir la membrana celular. En cuanto a los **folículos antrales**, éstos se definieron como aquellos en que se apreciaba un antro, (cavidad dentro del folículo con líquido o líquido folicular), y una capa de las células tecaes bien definida. Para definir los **quistes** son contabilizados los folículos sin ovocito con o sin capas de células de granulosa, con un gran cavidad antral y que además podían presentar hipertecosis (hipertrofia de las células tecaes) (Lara HE y cols. 2000). Los **folículos luteinizados** se caracterizaron por presentar células de la granulosa luteinizada, donde el citoplasma de estas célula crece y es muy semejante a las células del cuerpo lúteo. Además, estos folículos presentan un antro sin ovocito (Smith MF. y cols. 1994). Los **folículos tipo III**, por su parte, fueron folículos de más de 500 µm con un gran antro, que pudieron o no tener ovocito, conteniendo capas de granulosa muy condensada y desordenada. A su vez, para la identificación de estos folículos se tomó en cuenta la invaginación de células de la teca dentro de la granulosa (Brawer J y cols., 1986, Convery M. y cols. 1990). Por último, los **folículos atrésicos** se determinaron como aquellos que contenían más del 5% de células de la granulosa con núcleos picnóticos y con rompimiento de la vesícula germinal. Para la contabilización, ya sea de folículos preantrales como antrales, se consideró la visualización de ovocitos con núcleo (Lara HE y cols. 2000).

El análisis morfológico se realizó observando todos los cortes de los ovarios controles y experimentales, en un microscopio óptico marca Leica DM/SL con una reglilla de 10mm: 100 divisiones.

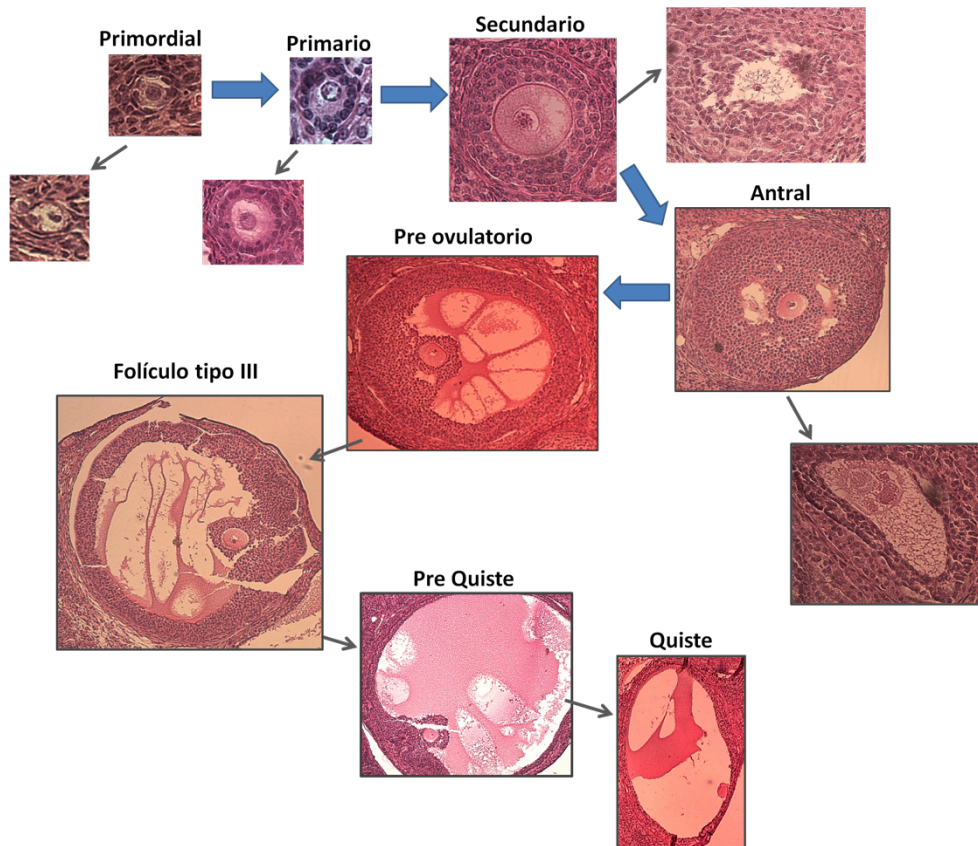


Figura 6. Microfotografías de la foliculogénesis y vías de desarrollo de estructuras anómalas como Folículos tipo III, Prequiste y Quiste. Flechas azules indican la vía de desarrollo folicular normal, flechas plomas indican vía de desarrollo atrésico (Primordial, Primario, Secundario y Antral) y vía de desarrollo de estructuras anómalas como Folículo tipo III, Prequiste y Quiste.

5.5. Homogenización de las muestras de ovario.

La mitad de un ovario se homogenizó manualmente en un homogenizador vidrio-vidrio considerando 4 volúmenes de DPBS (KCl 2,68 mM, NaCl 136,89 mM, KH_2PO_4 1,47 mM, Na_2HPO_4 8,1 mM, CaCl_2 0,9 mM, MgCl_2 0,49 mM) por peso de ovario (ej. 4 μl de DPBS por 1 mg de ovario). Las tres cuartas partes del homogeneizado se conservaron a -80°C para la posterior cuantificación de NA (Dorfman y cols., 2003 y Sotomayor 2008).

5.6. Determinación de NA y de MHPG en ovario.

Se cuantificó la concentración de NA y de su metabolito MHPG en el sobrenadante del homogenizado de ovario obtenido según se describió previamente. La cuantificación se realizó mediante la técnica de HPLC acoplada a un detector electroquímico EICOM ECD-700S. Una alícuota de 50 µl de sobrenadante, se mezcló con 50 µl de ácido perclórico (PCA) 0,2 N y la mezcla se filtró a través de membrana de PVDF desechables (Millex™ de 0,22 µm de poro). Posteriormente, 20 µl del filtrado fueron inyectados al sistema de HPLC (Jasco PU-2089s plus) acoplado a una tarjeta digitalizadora (Jasco LC-NetII/ADC). Para generar la integración de los cromatogramas, se utilizó el programa computacional JASCO ChromPass Chromatography Data System v1.7.403.1. La fase móvil utilizada fue un buffer de 0,1 M NaH₂PO₄, 0,107 mM de octil-sulfato, 0,02% EDTA y 1,5% acetonitrilo con un pH de 2,6. La velocidad del flujo utilizada fue de 1ml/minuto. El potencial del detector amperométrico fue de 650 mV para la NA y de 850 mV para el MHPG.

5.7. Determinación de la concentración de receptores β-adrenérgicos

Los receptores β₂-adrenérgicos están presentes en las células tecales y células de la granulosa del ovario de rata, esta inervación simpática juega un rol importante en la maduración de los folículos, secreción esteroidea y ovulación (Aguado y cols., 1982). Los receptores fueron determinados mediante la unión específica del ligando radioactivo Dihidroalprenolol-HCl (un bloqueador β-adrenérgico marcado

radioactivamente (levo-[anillo-propil-3H(N)] de laboratorios Perkin Elmer, y de concentración específica de 250 μ Ci (9,25 MBq), 104,4 Ci/mmol (3,863 TBq/mmol) en 0,25 ml de etanol).

Para este ensayo el ovario se pesó y se homogenizó en el equipo ultraturrax en 10 volúmenes de Tris-HCL 20mM / Sacarosa 0,25 M pH 7,4. El homogeneizado se centrifugó a 13.000 rpm por 30 minutos y se descartó el sobrenadante. El precipitado, el cual correspondió a la fracción enriquecida de proteínas, se re-suspendió en 100 μ l de buffer Tris-HCl 20 mM / MgCl₂ 10mM a pH 7,4 y se cuantificó utilizando el método de Bradford.

Para determinar la unión total de receptor-ligando se incubaron 20 μ g de proteínas en 200 μ l de buffer (Tris-HCl 20 mM/MgCl₂ 10mM a pH 7,4) y ³H-dihidroalprenolol diluido 1:200 a 37°C por 30 min. Terminada la incubación, la reacción se detuvo adicionando 2 ml del buffer Tris-HCl con Isoproterenol. El contenido se vertió en un sistema de filtración conectado al vacío que contienen filtros Whatman GF/C 1822-150 con un poro de 1,2 μ m. Para determinar la radioactividad se colocó el filtro con las proteínas unidas en un vial de centelleo, se adicionó 4 ml de mezcla de centelleo, biodegradable (ECOSCINT® National Diagnostic Atlanta USA) y 600 μ l de H₂O_d. Posteriormente se mezcló la solución y se contabilizó la radioactividad en un contador beta (Packard Liquid Scintillation Analyzer 1600TR; 72) con un 50% de eficiencia para tritio (³H). Para determinar la unión inespecífica, se procedió a realizar el mismo ensayo descrito anteriormente pero en presencia de 1mM de Isoproterenol.

La diferencia entre la unión total menos la inespecífica se tomó como la correspondiente unión específica receptor-ligando.

5.8. Isoproterenol

Isoproterenol, una amina sintética con actividad simpaticomimética (Flores, 1998). Se eligió para estimular en forma experimental, la vía de los receptores β -adrenérgicos. Este modelo tiene como referencia los trabajos de Benjamín y cols. (1989) y de Luna y cols (2012). A cada grupo experimental se les administró subcutáneamente isoproterenol (Sigma Chemical Co, USA) a una concentración de 125 ug/kg /día/por 10 días.

5.9. Análisis estadístico.

Los resultados se expresan como el promedio \pm error estándar. Fueron analizados mediante la prueba *t-student* y comparación entre grupos mediante la prueba de ANOVA con post test de comparación múltiple Turkey, utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 5, considerando $p < 0.05$ como diferencia significativa.

Se compraron los grupos de las diferentes edades, debido a que las ratas de 6 meses de edad están en el periodo fértil, donde el ovario funciona en condiciones óptimas, mientras que las ratas de 8 meses de edad comienza el deterioro de la función ovárica, ingresando a la etapa de subfertilidad.

6. Resultados

6.1. Objetivo 1.- Determinar los cambios histológicos observados en ovarios de ratas tratadas con isoproterenol, mediante el análisis morfológico durante el periodo de fertilidad y subfertilidad.

a. Estructuras Foliculares Totales

El número de estructuras totales, corresponde a la suma de folículos preantrales, saludables y atrésicos; folículos antrales, saludables y atrésicos; folículos luteinizados; estructuras quísticas (folículo tipo III, pre quiste y quistes); y cuerpos lúteos. Como se observa en la figura 7, no hubo cambios significativos en ratas tratadas con vehículo y con ISO de 6, 8 y 10 meses de edad.

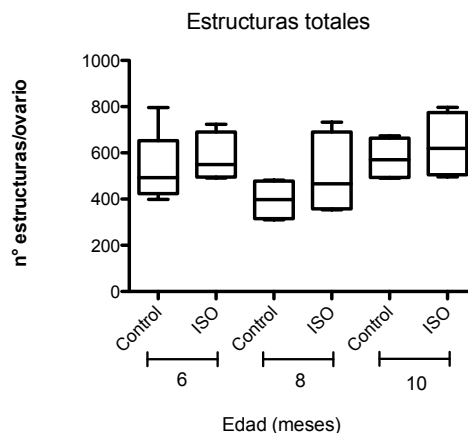


Figura 7. Cantidad de estructuras foliculares totales. El número de estructuras totales corresponde a la suma de folículos preantrales, saludables y atrésicos; folículos antrales, saludables y atrésicos; folículos luteinizados; estructuras quísticas (folículo tipo III, pre quiste y quistes); y cuerpos lúteos. Las barras corresponden al valor mínimo y máximo. El número de ovarios analizados son 5 para control de 6 meses de edad y 4 para las restantes. Se utilizaron las pruebas estadísticas: *t de Student* de una cola, y *ANOVA*.

b. Folículos Preantrales Totales

Para saber qué sucede con la reserva folicular, se contabilizaron los folículos preantrales totales (saludables y atrésicos). Como se observa en la figura 8, en ratas de 8 meses de edad, se observa una leve tendencia de disminución de la cantidad de folículos preantrales totales, sin diferencia estadística con ratas de 6 y 10 meses de edad. Al observar las ratas tratadas con ISO no se observan cambios en la cantidad total de folículos preantrales

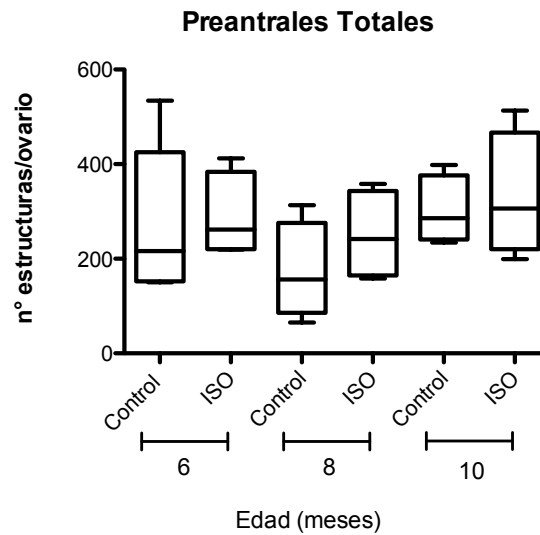


Figura 8. Folículos Preantrales Totales. El número de folículos preantrales totales es la suma de folículos preantrales saludables y atrésicos. Las barras corresponden al valor mínimo y máximo. El número de ovarios analizados son 5 para control de 6 meses de edad y 4 para las restantes. Se utilizaron las pruebas estadísticas: *t* de Student de una cola, y ANOVA.

c. Folículos Antrales Totales

Al observar el total de folículos antrales, no se encontraron cambios a medida que las ratas aumentan de edad. Mientras que se observa un aumento significativo en ratas de 6 meses de edad tratadas con ISO respecto a su control. A los 8 y 10 meses de edad, el tratamiento con ISO no produjo efectos (figura 9).

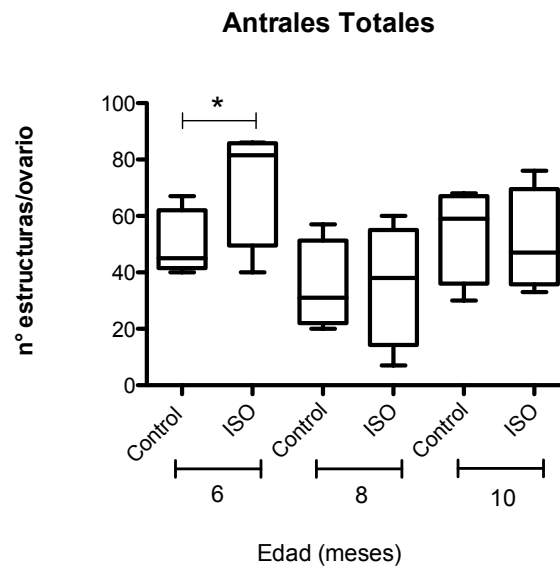


Figura 9. Folículos antrales totales. El número de folículos antrales totales es la suma de folículos antrales saludables y atrésicos. Las barras corresponden al valor mínimo y máximo. El número de ovarios analizados son 5 para control de 6 meses de edad y 4 para las restantes. La diferencia se obtiene con un *t de Student* de una cola, $p < 0,05 = *$.

d. Folículos Preantrales

Entre los folículos preantrales se han caracterizado 3 tipos de poblaciones, folículos primordiales, primarios y secundarios. Aunque no se observaron efectos del ISO en la población total de folículos preantrales, se analizó por separado cada una de las subpoblaciones de estos folículos, los que a su vez se estudiaron los folículos saludables y los atrésicos (figuras 10, 11 y 12).

d.1 Folículos primordiales totales, saludables y atrésicos

Se analizaron los folículos preantrales primordiales totales, saludables y atrésicos (figura 10 A, B y C). No se observan diferencias significativas con la edad ni con la administración de Isoproterenol en las distintas edades analizadas.

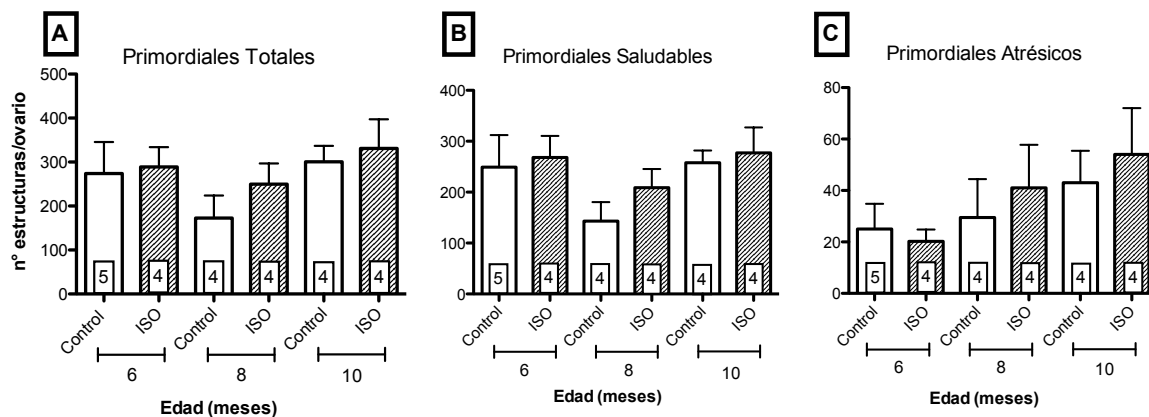


Figura 10. Folículos primordiales totales, Folículos primordiales saludables y Folículos primordiales atrésicos. (A) El número de Folículos primordiales totales es la suma de Folículos primordiales saludables y atrésicos. (B) Folículos primordiales saludables. (C) Folículos primordiales atrésicos. La barra corresponde al promedio \pm SEM, el número de ovarios analizados corresponde al número que está al interior del gráfico. Se utilizaron las pruebas estadísticas: *t de Student* de una cola, y ANOVA.

d.2 Folículos primarios totales, saludables y atrésicos

Se analizaron los folículos primarios totales, saludables y atrésicos (figura 11). En la figura 11A, no hay cambios en ratas controles a los 6, 8 y 10 meses de edad, sin embargo, muestran una tendencia a menor cantidad en ratas de 8 meses de edad. Las ratas tratadas con ISO a las mismas edades, no hay efecto. Al observar los folículos saludables (figura 11B), no se observan cambios en ratas controles a medida que avanzan de edad y no hay efecto en ratas tratadas con ISO. Como se muestra en la figura 11C, existe un aumento significativo en el número de folículos primarios atrésicos a los 10 meses de edad, comparado con ratas de 6 y 8 meses de edad. No se encontró efecto del ISO en ratas de 6, 8 y 10 meses de edad.

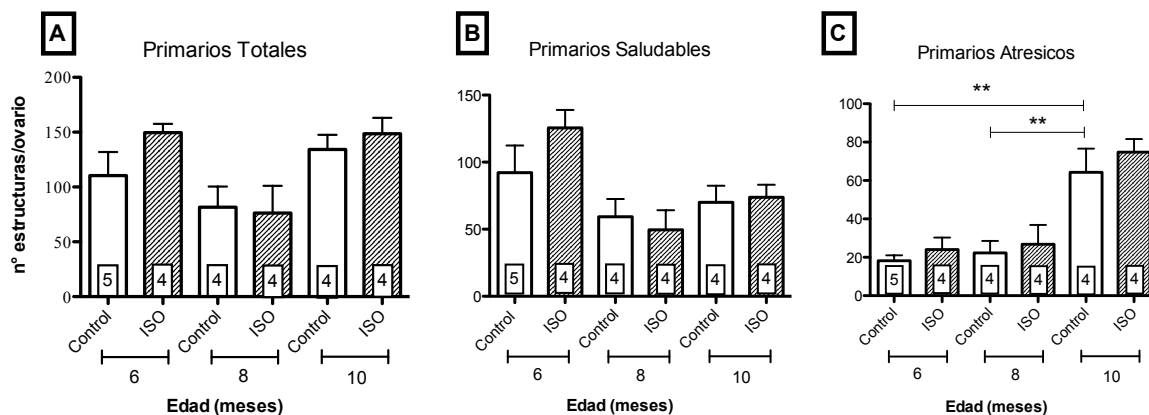


Figura 11. Folículos primarios totales, Folículos primarios saludables y Folículos primarios atrésicos. (A) El número de Folículos primarios totales es la suma de los Folículos primarios saludables y atrésicos. (B) Folículos primarios saludables. (C) Folículos Primarios Atrésicos. La barra corresponde al promedio \pm SEM, el número de ovarios analizados corresponde al número que está al interior del gráfico. La diferencia se obtiene con un ANOVA de una cola, $p < 0,01 = **$.

d.3 Folículos secundarios totales, saludables y atrésicos

Se analizaron los folículos preantrales secundarios totales, saludables y atrésicos (figura 12). Del total de folículos secundarios (figura 12A), se obtuvo una leve tendencia a la disminución a medida que las ratas envejecen, mientras que en ratas tratadas con ISO no se observan cambios. En la figura 12B, se encontró que los folículos secundarios saludables disminuyen con la edad; ratas tratadas con ISO existe un aumento significativo en ratas de 10 meses de edad respecto a su control. Como se observa en la figura 12C, la edad no cambia la cantidad de folículos secundarios atrésicos, en cambio, si administramos ISO se encuentra que sólo en ratas de 6 meses de edad hay una menor cantidad de folículos secundarios atrésicos.

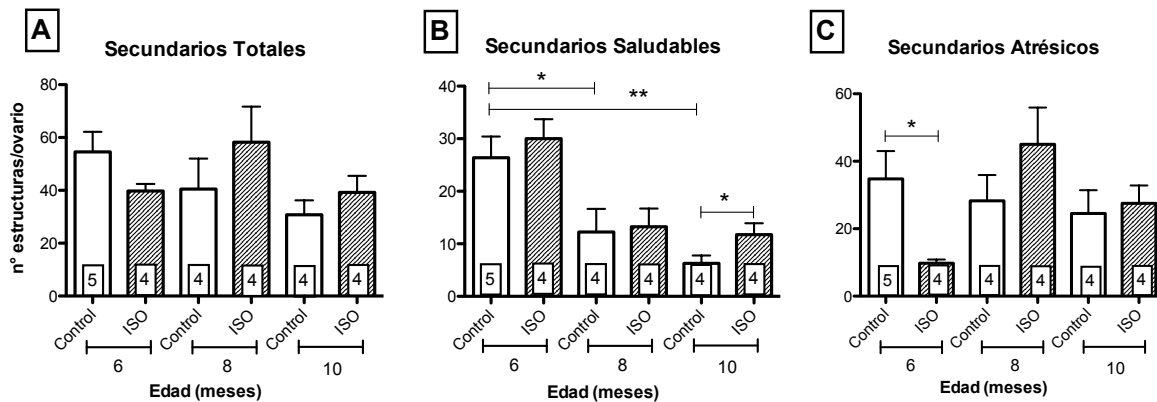


Figura 12. Folículos secundarios totales, Folículos secundarios saludables y Folículos secundarios atrésicos. (A) El número de Folículos secundarios totales es la suma de Folículos secundarios saludables y atrésicos. (B) Folículos secundarios saludables. (C) Folículos Secundarios Atrésicos. La barra corresponde al promedio \pm SEM, el número de ovarios analizados corresponde al número que está al interior del gráfico. La diferencia se obtiene con un *t de Student* de una cola, $p < 0,05 = *$. La diferencia se obtiene con un ANOVA de una cola, $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$.

e. Folículos antrales

e.1 Folículos Antrales saludables y atrésicos

El número de folículos antrales totales se muestra en la figura 13. En la figura 13A, observamos que a medida que las ratas envejecen disminuye la cantidad de folículos saludables. Mientras que a los 6 meses de edad, ratas tratadas con ISO se observa un aumento significativo de la cantidad de folículos antrales atrésicos respecto a su control (figura 13B).

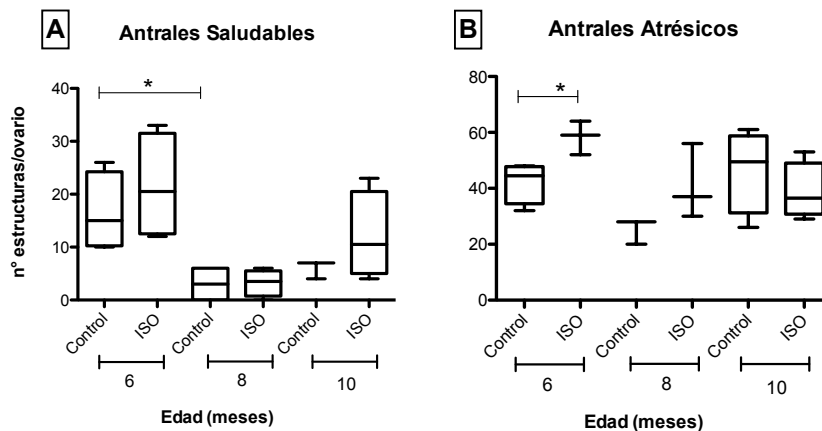


Figura 13. Folículos antrales saludables y Folículos antrales atrésicos. (A) Folículos antrales saludables. (B) Folículos antrales atrésicos. Las barras corresponden al valor mínimo y máximo. El número de ovarios analizados es 5 para ratas control de 6 meses de edad y 4 para las restantes. La diferencia se obtiene con un *t-test de Student* de una cola, $p < 0,05 = *$. La diferencia se obtiene con un *ANOVA* de una cola, $p < 0,05 = *$.

f. Estructuras Quísticas

A medida que las ratas se acercan al periodo de subfertilidad se observó un mayor número de folículos quísticos (figura 14C), mientras que las ratas tratadas con ISO no hay un aumento en la cantidad de estas estructuras, excepto en ratas de 10 meses de edad donde encontramos que el tratamiento disminuyó la cantidad de quistes. La figura 14B, muestra la cantidad de prequistes y observamos una leve tendencia hacia el aumento a medida que las ratas aumentan de edad y si son administradas con isoproterenol. Los folículos tipo III (figura 14A) no aumentan con la edad, sin embargo, si administramos ISO, en las tres edades estudiadas hay un aumento significativo en la cantidad.

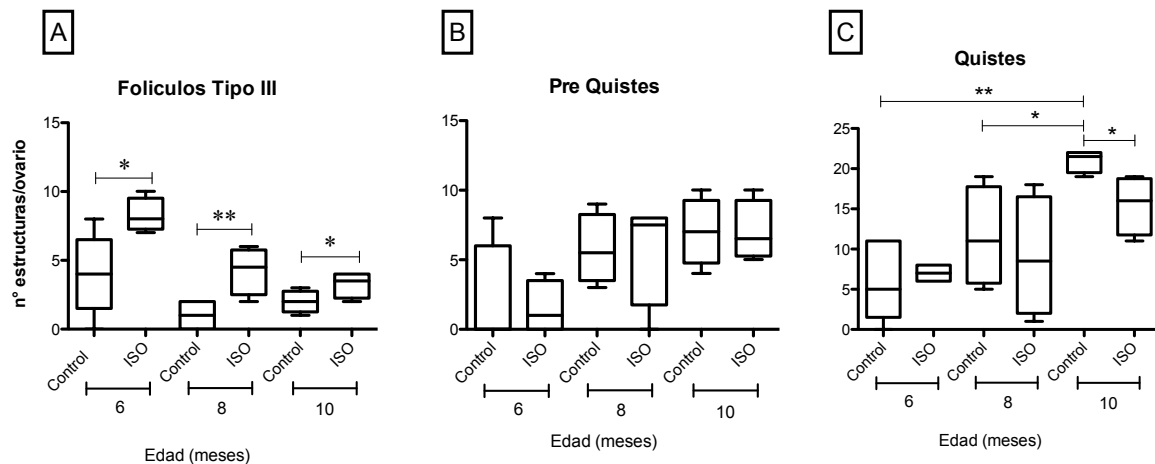


Figura 14. Estructuras quísticas (A) Folículos Tipo III. (B) Prequistes. (C) Quistes foliculares. Las barras corresponden al valor mínimo y máximo. El número de ovarios analizadas son 5 para control de 6 meses de edad y 4 para las restantes. La diferencia se obtiene con un ANOVA de una cola, $p < 0,05$ = *, $p < 0,01$ = **.

6.2. Objetivo 2.- Determinar la ciclicidad estral, los niveles de las hormonas esteroideas plasmáticas y los niveles de la hormona peptídica AMH en animales tratados con Isoproterenol, durante el periodo de fertilidad y subfertilidad.

a. Ciclicidad estral en ratas tratadas con ISO

La ciclicidad estral es un muy buen parámetro del comportamiento de la funcionalidad ovárica del animal, pues los cambios en el epitelio vaginal, suelen ser indicativos de las variaciones hormonales propias de la ciclicidad estral. Como se observa en las figuras 15 A, C y E, las ratas a medida que progresa la edad, desde la fertilidad óptima (6 meses de edad) hacia el periodo de subfertilidad (10 meses de edad) comienzan a tener menos ciclos y estos son irregulares, mientras que en las ratas administradas con ISO, los ciclos estrales no se alteraron con el tratamiento figuras 15 B, D y E.

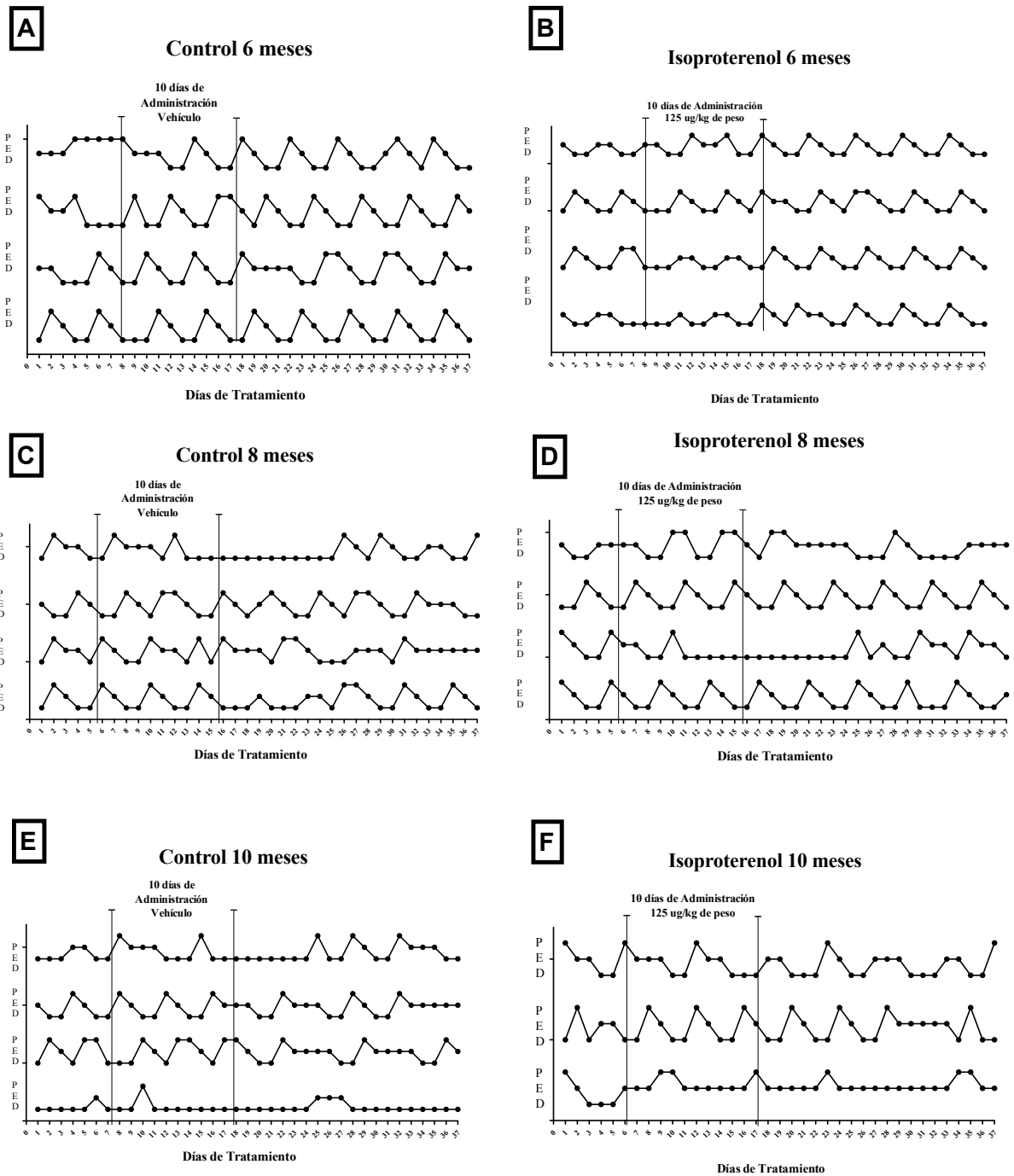


Figura 15. Gráficos representativos de la ciclicidad estral. Animales de 6 meses de edad (A) control, (B) Isoproterenol; animales de 8 meses de edad (C) control y (D) Isoproterenol; animales de 10 meses de edad (E) control y (F) Isoproterenol. Se grafica como P = proestro, E = estro y D = metaestro y diestro. La ciclicidad se obtuvo mediante frotis vaginal diario con observación al microscopio. Un ciclo estral normal se considera como el paso de P a E, seguido necesariamente por un D. Las barras indican los 10 días de tratamiento.

Al analizar el porcentaje de ovulación, que corresponde a un ciclo completo de proestro-estro y diestro, observamos que a medida que avanza hacia la subfertilidad las ratas dejan de ovular, ya que hay una disminución significativa hacia los 10 meses de edad. Las ratas tratadas con ISO a los 6 meses de edad no afecta el porcentaje de ovulación respecto a su control; efecto que se repite en las ratas de 8 y 10 meses de edad tratadas con ISO (figura 16). Si desglosamos cada estado del ciclo, podemos concluir que, existe una tendencia hacia la disminución del porcentaje de diestros a medida que las ratas entran a la etapa de subfertilidad (figura 17A). Al comparar las ratas tratadas con ISO, no se observa aumento o disminución del porcentaje de diestros en las diferentes edades. El porcentaje de proestros (figura 17B) no se observan cambios en las diferentes edades; efecto similar en las ratas tratadas con ISO en las diferentes edades. Como se observa en la figura 17C, a medida que las ratas envejecen hay un aumento significativo del porcentaje de estros, recordemos que las ratas a medida que avanzan en edad presentan un aumento del número de quistes que se relaciona con un ciclo estral continuo. Mientras que las ratas tratadas con ISO no se observa un aumento ni disminución del porcentaje de estros en las diferentes edades.

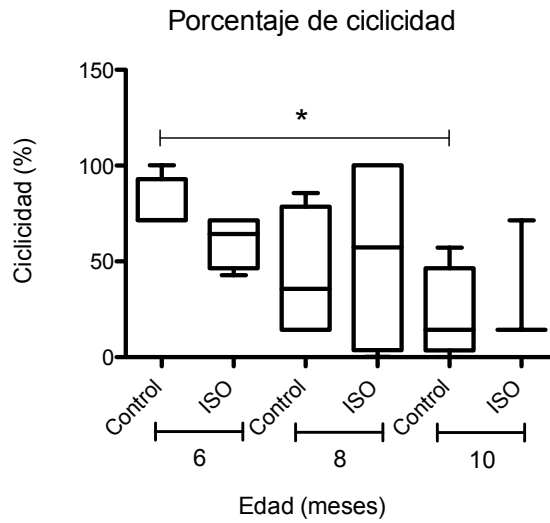


Figura 16. Porcentaje de ciclicidad. Determinado como el porcentaje de ratas que han presentado al frotis vaginal un ciclo completo (proestro-estro-metaestro y diestro). Las barras corresponden al valor mínimo y máximo. El número de ratas analizadas son 4 y 3 para el grupo de 10 meses ISO. La diferencia se obtiene con un *t de Student* de una cola, $p < 0,05 = *$.

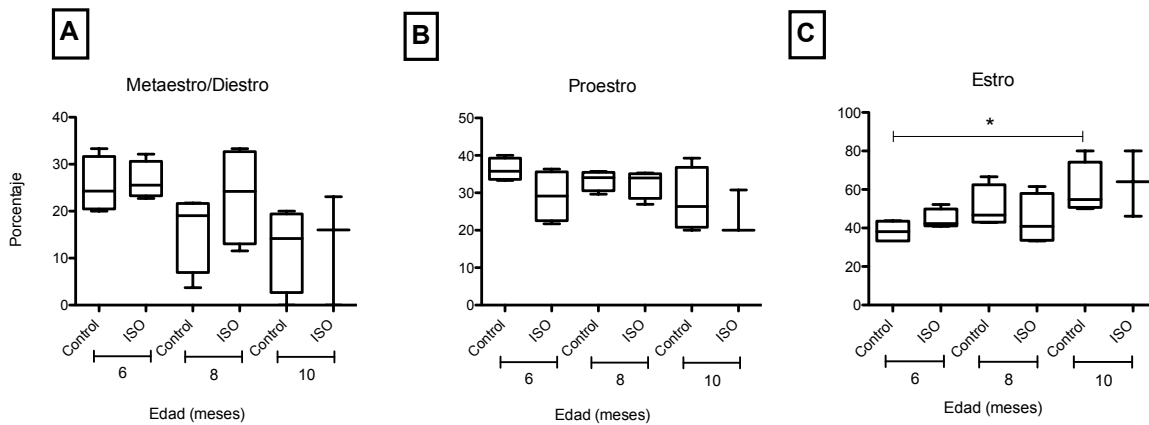


Figura 17. Porcentaje de permanencia en las diferentes etapas del ciclo estral. Corresponde al porcentaje de ratas que han presentado al frotis vaginal Metaestro/Diestro (A), Proestro (B) y Estro (C). Las barras corresponden al valor mínimo y máximo. El número de ratas analizadas son 4 y 3 para el grupo de 10 meses ISO. La diferencia se obtiene con un *t de Student* de una cola, $p < 0,05 = *$.

b. Niveles de las hormonas esteroidales plasmáticas

Los niveles de las hormonas esteroidales Progesterona (P), Androstenediona (A) y Estradiol (E) plasmáticas se muestra en la figura 18. Los niveles de las tres hormonas estudiadas disminuyen progresivamente con la edad, observando una disminución en el periodo de subfertilidad.

La progesterona sérica disminuye progresivamente con el avance de la edad respecto al control de 6 meses de edad (periodo de fertilidad óptima) (figura 18A). La activación β -adrenérgica dada por la administración de ISO afecta en forma diferencial el contenido de hormona sérica dependiendo de la edad del animal. En ratas de 6 meses de edad tratadas con ISO, los niveles de P disminuyen significativamente respecto a su control, al cuantificar la cantidad de cuerpos lúteos observamos que hay una disminución significativa respecto a su control (figura 19A). A los 8 meses de edad no se observan diferencias significativas en los niveles de progesterona sérica ni cantidad de cuerpos lúteos (figuras 18A y 19A respectivamente). Mientras que a los 10 meses de edad, se observa una tendencia a la disminución de los niveles de P y cantidad de cuerpos lúteos comparados con 6 y 8 meses de edad, sin embargo, se observa un aumento significativo de la cantidad de cuerpos lúteos a los 10 meses de edad ISO respecto a su control (figuras 18A y 19A).

Los niveles de Androstenediona en ratas de 6 meses de edad tratadas con ISO también presentan una disminución significativa respecto a su control (figura 18B); a

los 8 meses de edad no se observó efecto de ISO, sin embargo, al avanzar en edad, las ratas de 10 meses de edad mostraron un aumento significativo respecto a su control de 10 meses de edad.

Los niveles de Estradiol a los 6 meses de edad ISO se observó una disminución significativa respecto a su control (figura 18C); y a los 8 y 10 meses de edad no se observó efecto del ISO.

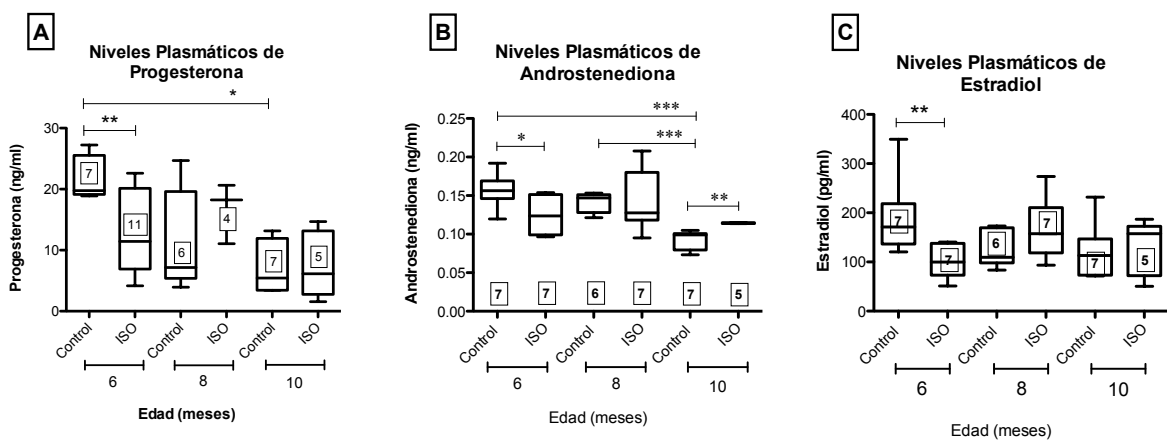


Figura 18. Concentración plasmática de hormonas esteroidales. (A) niveles de progesterona plasmática, (B) niveles de androstenediona, y (C) niveles de estradiol. Dentro de cada barra se indica en número de animales en cada medición. Las barras corresponden al valor mínimo y máximo. La diferencia se obtiene con un *t-test de Student* de una cola, $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$; y ANOVA de una cola, $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$.

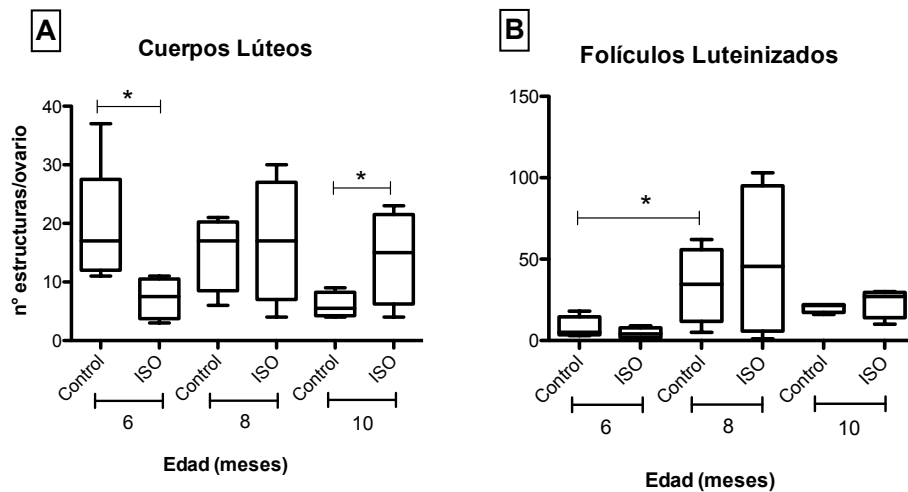


Figura 19. Cuerpos lúteos y Folículos luteinizados. Las barras corresponden al valor mínimo y máximo. El número de ovarios analizados son 5 para control de 6 meses de edad y 4 para las restantes. La diferencia se obtiene con un *t de Student* de una cola, $p < 0,05 = *$ y ANOVA de una cola $p < 0,05 = *$.

c. Niveles de la hormona peptídica AMH

Evidencias descritas en la literatura han demostrado que los niveles de AMH séricos pueden ser utilizados como un indicador de la reserva folicular, permitiendo relacionar los niveles de AMH séricos con el contenido de folículos primordiales. La concentración de AMH (figura 20) no cambia en ratas controles entre 6 y 8 meses de edad, sin embargo, se observó una disminución de los niveles plasmáticos de la hormona en ratas de 10 meses de edad, comparado con ratas de 8 meses de edad. El tratamiento con ISO no alteró los niveles de AMH en ratas de 6 y 8 meses de edad, pero si aumentaron los niveles de AMH en ratas de 10 meses de edad.

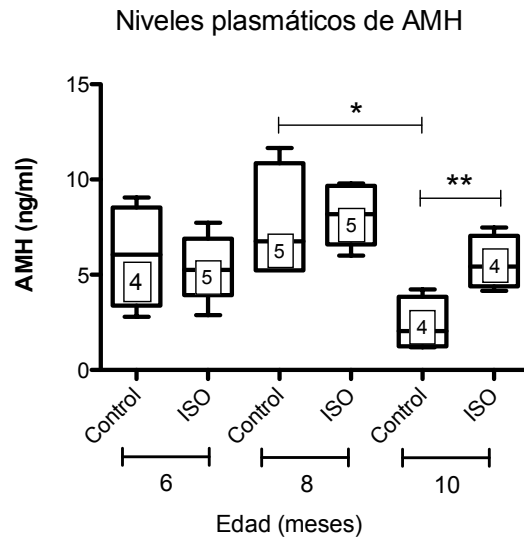


Figura 20. Niveles plasmáticos de la hormona peptídica AMH. Las barras corresponden al valor mínimo y máximo. La diferencia se obtiene con un *t de Student* de una cola, $p < 0,01 = **$ y ANOVA de una cola, $p < 0,05 = *$.

6.3. Objetivo 3.- Determinar el contenido de receptores β -adrenérgico, noradrenalina ovárica y su metabolito MHPG (3-metoxi-4-hidroxifenilglicol) en ratas tratadas con Isoproterenol, durante el periodo de fertilidad y subfertilidad.

a. Concentración de receptores β -adrenérgicos

Al observar la concentración de receptores β -adrenérgicos en ratas tratadas y sus controles no observamos cambios en las diferentes edades estudiadas (figura 21).

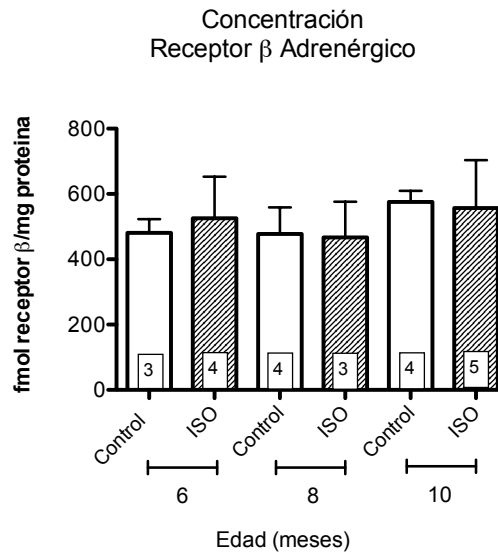


Figura 21. Concentración de receptores β -adrenérgicos. La barra corresponde al promedio \pm SEM, el número de ovarios analizados corresponde al número que está al interior del gráfico. Se utilizaron las pruebas estadísticas: *t de Student* de una cola, y ANOVA.

b. Concentración de NA y su metabolito MHPG ovárico

La regulación del ovario, posee un importante componente dado por el SNS, por tanto al estimular esta comunicación con el ovario, activando los receptores β -adrenérgicos, esperábamos observar un aumento en la actividad del SNS que inerva el ovario, para ello se determinó la concentración de NA y de su metabolito MHPG.

Como se observa en la figura 22, la concentración de catecolaminas no es modificada por la edad ni por el tratamiento con Isoproterenol en ratas durante el periodo de fertilidad ni subfertilidad. La noradrenalina ovárica corresponde a la que se encuentra contenida en las vesículas de los terminales nerviosos simpáticos, al no detectar cambios en la concentración de NA, se determinó la síntesis de catecolaminas midiendo su metabolito, y así observar un aumento en la liberación o una disminución en la síntesis. Para poder observar este cambio (como reflejo de la actividad del terminal nervioso) se midió la concentración de MHPG ovárico, el principal metabolito formado por la acción secuencial de las enzimas monoamino oxidasa (MAO) y catecol-o-metil transferasa (COMT) en el terminal nervioso.

La figura 23 muestra la concentración de MHPG donde se observa que ni la edad ni el tratamiento modifica la concentración del metabolito. Al comparar las ratas tratadas con Isoproterenol no existe diferencia significativa con sus controles (el equipo sólo detectó algunas muestras del total medidas). Utilizando los resultados

anteriores (figuras 22 y 23), se comparó la concentración de [MHPG]/[NA] en el tejido ovárico de ratas en el periodo de subfertilidad. Existe un menor recambio a los 10 meses de edad comparados a los 6 meses, y al administrar ISO en esta edad también observamos un menor recambio (figura 24).

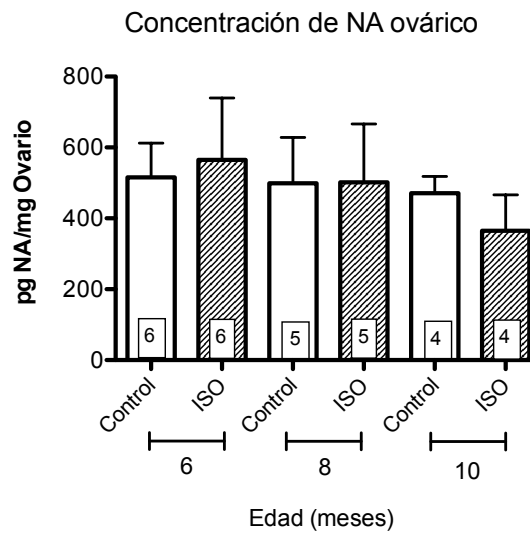


Figura 22. Concentración de NA ovárica. La barra corresponde al promedio \pm SEM, el número de ovarios analizados corresponde al número que está al interior del gráfico. Se utilizaron las pruebas estadísticas: *t de Student* de una cola, y *ANOVA*.

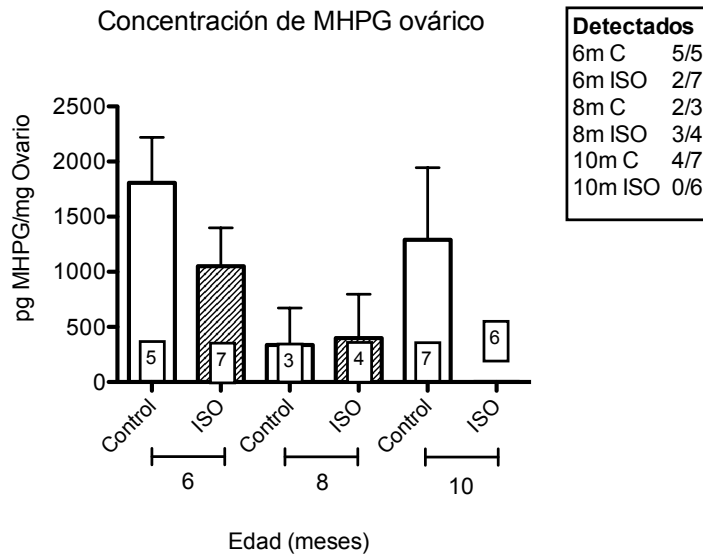


Figura 23. Concentración de MHPG ovárico. La barra corresponde al promedio \pm SEM, el número de ratas analizadas son 5 para control de 6 meses de edad y 4 para las restantes. Se utilizaron las pruebas estadísticas: *t de Student* de una cola, y ANOVA.

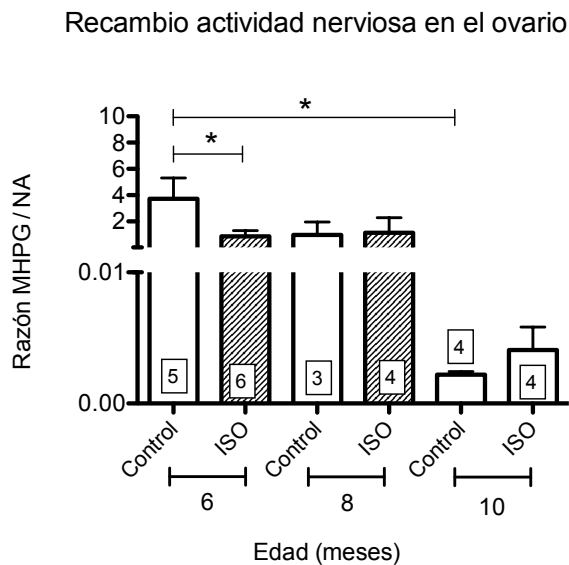


Figura 24. Razón MHPG/NA ovárica. La barra corresponde al promedio \pm SEM, el número de ratas analizadas son 5 para control de 6 meses de edad y 4 para las restantes. La diferencia se obtiene con un *t de Student* de una cola, $p < 0,05 = *$ y ANOVA de una cola, $p < 0,05 = *$.

7. Discusión

El presente trabajo tuvo como objetivo estimular los receptores β -adrenérgicos con un agonista, Isoproterenol, para simular un efecto de sobre-estimulación simpática en el ovario de ratas en periodo de fertilidad y subfertilidad, y así experimentalmente determinar si la activación β -adrenérgica puede adelantar la subfertilidad en ratas fértiles. En el periodo de subfertilidad y al final del periodo reproductivo, tanto nuestro laboratorio como otros investigadores, han demostrado que existe un aumento espontáneo de estructuras quísticas en el ovario con el envejecimiento ovárico, lo que se correlaciona con un aumento en la actividad simpática del ovario, dada por el aumento en la liberación y contenido de NA ovárica (Acuña y cols., 2009 y Chávez-Genaro y cols., 2007). En ratas Sprague Dawley, la subfertilidad se inicia de los 8 meses de edad, ya que a esta edad la ciclicidad estral se ve afectada, también existe una disminución del porcentaje de ovulación, el porcentaje de partos disminuye más de un 50% y los niveles de las hormonas esteroidales también están disminuidas comparadas con ratas de 6 meses de edad con óptima fertilidad (Acuña 2008).

La dosis utilizada del agonista β -adrenérgico, induce hipertrofia cardiaca, (Benjamin y cols 1989), y es una excelente herramienta para inducir *in vivo* una sobre estimulación de los receptores β -adrenérgicos (Luna y cols., 2012). Estos autores demostraron que esta dosis administrada en ratas jóvenes durante 10 días consecutivos y observadas 30 días después, produce un aumento de las estructuras foliculares prequísticas y quísticas. En nuestro estudio, al administrar ISO en ratas de

6, 8 y 10 meses de edad observamos un aumento de estructuras quísticas como los folículos tipo III, estructuras que en nuestro grupo de trabajo, se sugiere que son los precursores tempranos de los quistes foliculares responsables de la anovulación en ratas (Acuña y cols., 2009). Según el desarrollo de estas estructuras vista por Lara y cols (2000) 30 y 60 días post- tratamiento con VE podríamos sugerir que el tiempo necesario para visualizar quistes foliculares en estas ratas fue muy corto, ya que el tiempo que demora en pasar de folículo tipo III a quistes es aproximadamente 60 días, por lo tanto, sugerimos más estudios en estos tiempos. Por otro lado, si se bloquea esta sobre-activación con un antagonista β -adrenérgico, como propanolol, se observa un aumento del número de folículos sanos y una disminución de la cantidad de folículos quísticos (Fernandois y cols., 2012). Estos antecedentes en conjunto sugieren que el SNS tiene un rol importante en fomentar el desarrollo de estructuras quísticas tanto en ratas fértiles como subfértiles.

Tanto en mujeres como en otros mamíferos, el tamaño de la reserva ovárica disminuye drásticamente con la edad (Gougeon, 2004). En mujeres, la atresia folicular se produce durante toda su vida, antes o después del reclutamiento folicular de manera dependiente o independiente del ciclo menstrual, tanto jóvenes como mayores. Sin embargo, no se conoce la regulación de estas dinámicas cambiantes del folículo durante el envejecimiento ovárico (Wilkosz y cols. 2014). Al analizar la morfología ovárica, la atresia de estos folículos es difícil de apreciar, ya que el ovocito es la primera célula en desaparecer, lo que sugiere que el ovocito puede

tener un mecanismo intrínseco para la activación de la apoptosis (Gougeon, 2004). Aunque la apoptosis puede ocurrir en todas las etapas del desarrollo folicular, en roedores, los folículos preantrales en transición a antrales son muy susceptibles a la atresia folicular (Mcgee y Hsueh 2000). En nuestro estudio, hemos querido analizar los cambios en la morfología ovárica durante el envejecimiento reproductivo, comparando la edad y sobre-estimulación de los receptores β -adrenérgicos en ratas fértiles y subfértiles. Durante el envejecimiento ovárico se observó un aumento de la cantidad de folículos primarios atrésicos; una disminución de los folículos secundarios saludables; una disminución de la cantidad de folículos antrales saludables, efecto que fue observado en todas las edades. Todas estas observaciones concuerdan con un inicio de la alteración de la reserva folicular, datos que también coinciden con los cambios observados durante el envejecimiento ovárico de la rata, publicado por Acuña y col. (2009) y Chávez-Genaro y cols. (2007). Por otro lado, como se observa en la figura 25, la administración de ISO no afectó el reclutamiento folicular ni el crecimiento de los folículos antrales en todas las edades estudiadas; sin embargo, en ratas fértiles de 6 meses de edad, este agonista aumentó la atresia de los folículos antrales, sugiriendo una detención de la ovulación, semejante a lo observado en ratas de 10 meses de edad sin tratamiento, indicando que el ISO aumenta la atresia de los folículos antrales, alterando el desarrollo folicular de forma semejante a las características de un ovario de rata subfértil (Acuña y cols 2009). Estas alteraciones también fueron observadas en el modelo experimental de ovario poliquístico inducido con VE en ratas jóvenes de 2 y 6 meses de edad (Sotomayor-Zárate y cols. 2007, Cruz y cols. 2012). Específicamente se

observó que una dosis única de VE neonatal es capaz de generar un efecto deletéreo tanto en la foliculogénesis como en la esteroidogénesis, modificando permanentemente la actividad simpática del ovario y generando cambios en el desarrollo folicular adulto, lo que llevó a una condición de ovario poliquístico (Sotomayor-Zárate y cols., 2008), que persistieron durante toda la vida reproductiva. Por el contrario, en nuestro estudio se administró un β -agonista por 10 días y se observó 20 días después, no se observaron efectos permanentes en los ovarios de las ratas tratadas, ya que recordemos que la foliculogénesis en rata demora unos 61 días aproximadamente (Mcgee y Hsueh, 2000), es posible que el tiempo necesario para visualizar cambios importantes como en el reclutamiento folicular no fueron observados, es por ello, que se sugiere estudiar a los 30 ó 60 días post tratamiento con ISO en estas edades. Por otro lado, observamos un efecto en ratas de 6 meses de edad ya que al compararlas con ratas de 10 meses sin tratamiento se asemejan morfológicamente, es decir, observamos que en estas ratas fértiles un adelanto del envejecimiento.

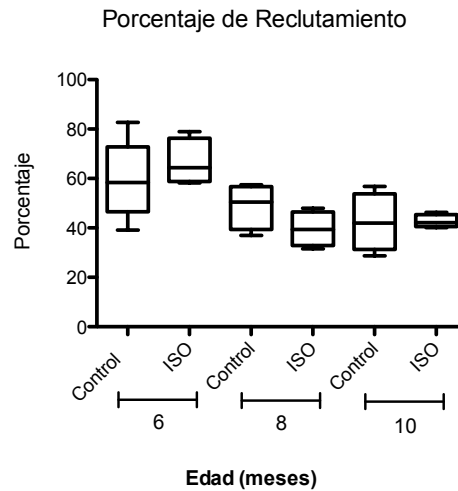


Figura 25. Porcentaje de reclutamiento. Las barras corresponden al valor mínimo y máximo, el número de ratas analizadas son 5 para 6 meses de edad control y 4 para los restantes. Se utilizaron las pruebas estadísticas: *t de Student* de una cola, y *ANOVA*.

En este trabajo, se observó que a medida que las ratas envejecen, pierden la capacidad de ciclar. Las ratas de 10 meses de edad comienzan a tener ciclos irregulares, por consiguiente no ovulan, comparadas con ratas jóvenes de 6 meses de edad. Esta condición fue demostrada en nuestro análisis comparando el porcentaje de ciclicidad de ratas de 6 meses de edad versus ratas de 10 meses de edad. Sin embargo, la administración de ISO no afectó el porcentaje de ciclicidad de las ratas tratadas, sugiriendo que el tratamiento no compromete la ovulación, datos que concuerdan con lo publicado por Luna (2013).

Otro factor que determina la subfertilidad es la disminución de las hormonas esteroidales. La producción de estas hormonas por el ovario está sujeta a un complejo mecanismo de regulación en el que las hormonas hipofisarias FSH y LH

juegan el papel determinante. Si observamos la evolución de las diferentes hormonas a lo largo del ciclo menstrual, es evidente que el ovario responde de manera muy precisa a la estimulación de las hormonas hipofisarias (figura 26). Al observar la figura 26, vemos que el ciclo estral de la rata es de 4 días (barras grises indican la noche, 6 p.m. 06 a.m.), observamos las fluctuaciones de: estrógenos, progesterona, LH y FSH. Por el contrario, en mujeres el ciclo menstrual es de 28 días.

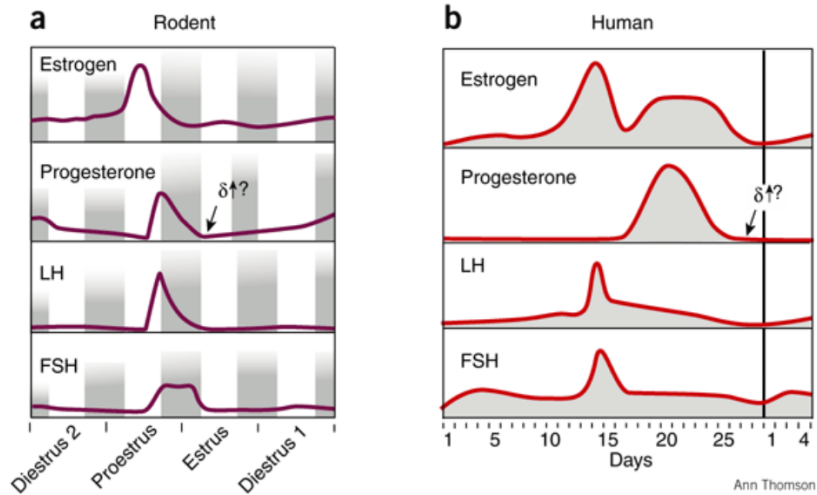


Figura 26. Comparación del ciclo estral de la rata (a) y el ciclo menstrual de la mujer (b) (Staley y Scharfman, 2005)

En nuestro laboratorio hemos observado que a medida que las ratas avanzan hacia la subfertilidad existe una disminución de los niveles plasmáticos de las hormonas esteroidales, como progesterona, androstenediona y estradiol (Acuña y cols. 2009) resultados encontrados en nuestro trabajo. Sin embargo, la administración de ISO sólo afectó la síntesis de estas hormonas en ratas de 6 meses de edad, datos que se

relacionarían con la menor cantidad de folículos saludables y cuerpos lúteos que son las principales estructuras donde se sintetizan estas hormonas. Semejante a lo observado en ratas viejas por Acuña y cols (2009). Por lo tanto, esto sugiere que las ratas de 6 meses de edad al sobre-estimular los receptores β -adrenérgicos, se asemejarían a las ratas de 10 meses de edad, donde se observó que a esta edad disminuyeron los niveles plasmáticos de progesterona y cantidad de CL. Por otro lado, al observar las ratas de 8 meses de edad el tratamiento con ISO no afectó la foliculogénesis ni la síntesis hormonal. En ratas tratadas de 10 meses de edad, observamos un aumento en la cantidad de cuerpos lúteos, que no se relaciona con un aumento de los niveles de progesterona plasmática. Como se observa en la figura 27, la mayoría de los cuerpos lúteos se concentran en tamaños pequeños, estructuras que no son capaces de sintetizar esta hormona ya que son estructuras de ciclos anteriores, sugiriendo una detención en la atresia de estas estructuras, por lo cual, se sugiere mayores estudios para determinar alguna falla en la ruta de la esteroidogénesis o falla de la apoptosis de estos cuerpos lúteos. Por otro lado, encontramos un aumento en los niveles plasmáticos de la hormona androstenediona, sugiriendo una estrecha relación con el aumento de folículos tipo III a esta edad (Aguado, 1982). Los folículos tipo III se caracterizan por poseer una gran capa de CG y una capa de CT hipertrofiada, las cuales poseen, receptores estrogénicos y LHR (Bao y cols. 2000). Con estos datos sugerimos que la sobre-estimulación de los receptores β -adrenérgicos afectaría la fertilidad de las ratas de 6 meses de edad, ya que afecta tanto la foliculogénesis como las síntesis de hormonas esteroidales (figura 29). Sin embargo, estos efectos no son observados en ratas

subfértiles 20 días post administración del agonista β -adrenérgico sugiriendo un efecto de down-regulation de los receptores, siendo un efecto de protección ante la sobre estimulación del ISO sobre el ovario, de forma similar a lo que ocurre en el caso del corazón, otro órgano regulador de forma importante por el tono simpático (Sanz-Rosa, 2011). Este efecto de down-regulation en el ovario requiere ser aclarado con un futuro estudio.

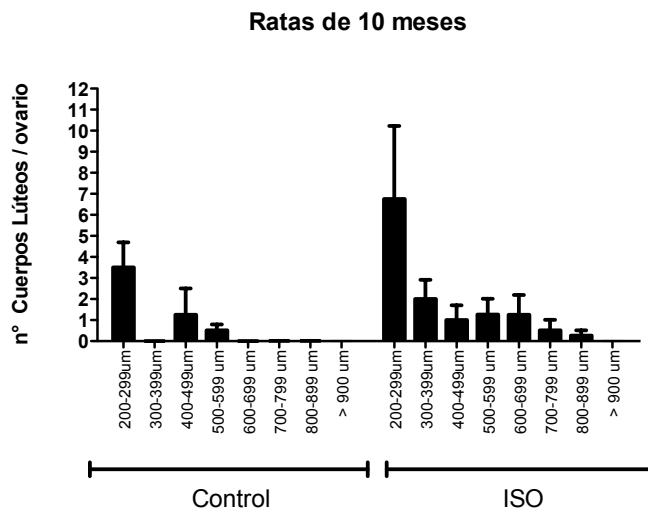


Figura 27. Tamaños de cuerpos lúteos en ratas de 10 meses de edad. Las barras corresponden al promedio \pm SEM, el número de ratas analizadas son 4.

El agotamiento de la reserva folicular resulta en el cese de la menstruación y por ende de la capacidad reproductiva. La caída de los niveles plasmáticos de estrógeno e inhibina produce elevadas concentraciones de FSH y LH, produciendo en la mujer cambios físicos, emocionales y funcionales (Swanton y Child, 2005). Por este motivo hemos analizado los niveles plasmáticos de LH para comparar los resultados con lo

que se observa en la rata. A medida que la rata ingresa a la etapa de subfertilidad aumentan los niveles plasmáticos de LH (figura 28). Este efecto no es observado al sobre-estimular los receptores β -adrenérgicos, ya que el ISO es un fármaco que no atraviesa la barrera hematoencefálica (Flores 1998), y a su vez estamos evaluando el efecto 20 días después de terminado la administración de ISO cuando, probablemente todo el ISO administrado fue degradado. Si bien la NA regula la actividad de las neuronas gonadotropicas, el fármaco al no cruzar la barrera hematoencefálica no afectaría la secreción de LH y no debería observar un efecto directo en la síntesis de hormonas esteroidales. El efecto esperado era un aumento en los niveles de LH y que se deba principalmente al cambio de hormonas esteroidales, por el mecanismo de down-regulation en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, lo que no fue observado.

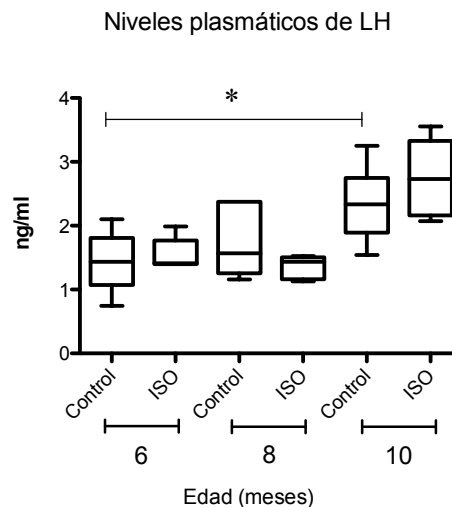


Figura 28. Niveles plasmáticos de la LH. Las barras corresponden al valor mínimo y máximo, el número de ratas analizadas son 5 para 6 y 8 meses de edad, y 6 para ratas de 10 meses de edad. La diferencia se obtiene con ANOVA de una cola, $p < 0,05 = *$.

Evidencias descritas en la literatura han demostrado que los niveles de AMH séricos pueden ser utilizados como un indicador de la reserva folicular, permitiendo relacionar los niveles de AMH séricos con el contenido de folículos secundarios sanos (Buyuk y cols, 2011). Como el ISO afecta el desarrollo folicular, resulta interesante medir los niveles de AMH para determinar que sucede con los folículos preantrales. Nuestros datos indican que la AMH plasmática disminuye a los 10 meses de edad comparados con ratas de 8 meses de edad, relacionándolos con la menor cantidad de folículos secundarios a los 10 meses. En ratas tratadas, se observó un aumento de los niveles plasmáticos de AMH a los 10 meses de edad, lo que se relacionaría con un aumento en el número de folículos secundarios saludables observados en este grupo, indicando un aumento en el reclutamiento folicular, al observar la figura 25, al realizar el análisis no existe un aumento en el porcentaje de reclutamiento, es por ello que sugerimos que los altos niveles de AMH estaría generando una detención del crecimiento hacia folículos antrales, ya que la acción autocrina de la AMH en las CG de estos folículos podrían controlar la maduración folicular y/o la selección del folículo a ovular (Baarends y cols. 1995). Como ha sido demostrado en mujeres la AMH es altamente expresada y secretada por las CG del cúmulo en pacientes de edad avanzada, sugiriendo que la AMH puede estar involucrada en el proceso de envejecimiento folicular (Kedem y cols., 2014). También se ha demostrado que existe altos niveles plasmáticos de AMH en pacientes con PCO debido al aumento de folículos antrales pequeños y que sus CG secretan más esta hormona (Pellat y cols., 2010). Según los datos obtenido por Martínez (2014) en el modelo de PCO en ratas al administrar EV neonatal indujo una

sobre-expresión de AMH debido a modificaciones epigenéticas, abriendo un nuevo mecanismo para comprender esta patología que afecta a mujeres. En nuestro caso, sugerimos medir los niveles plasmáticos de AMH a los 30 y 60 días después de la última dosis de ISO, acordes de los tiempos del desarrollo folicular como reclutamiento y formación de quistes foliculares en las distintas edades estudiadas.

El ovario es regulado por el sistema nervioso simpático, comienza en el hipotálamo y desde allí se proyectan neuronas que mediante una serie de sinapsis, viajan por la médula espinal para salir y hacer relevo en el ganglio celiaco, lugar donde se ubica el soma de las neuronas simpáticas que proyectan sus terminales nerviosos hacia el ovario. Los nervios simpáticos liberan desde sus terminales nerviosos principalmente el neurotransmisor NA. Los nervios simpáticos ováricos participan en el desarrollo folicular, secreción de esteroides y ovulación a través de la activación del receptor β_2 -adrenérgico. Por lo tanto, cambios en la actividad nerviosa del ovario pueden alterar la correcta fisiología ovárica y desencadenar eventos que lleven a patologías ováricas (Dorfman y cols. 2003). Al analizar la regulación nerviosa del ovario, los niveles de los receptores β -adrenérgicos varían con la edad, aumentando a los 6 y 12 meses de edad, aunque no existe diferencia significativa en las edades estudiadas (6, 8 y 10 meses de edad) (Fernandois 2011,). Además la presencia de adrenoreceptores β_2 en las células tecales y células de la granulosa del ovario de rata fluctúan en relación al ciclo estral, pico de LH y a la formación de cuerpos lúteos (Aguado y cols 1982, Ferruz y cols. 1991). La importancia de esto radica en que las ratas estudiadas fueron eutanasiadas en estro, por ende, los niveles encontrados de

los receptores β -adrenérgicos son los basales. Por otro lado, durante la etapa de subfertilidad en ratas, se ha encontrado un aumento de noradrenalina, aumento que es precedido por un aumento de NGF, generando un aumento de la formación de folículos quísticos (Acuña y cols. 2009 y Nugent y cols 2012). Estos altos niveles de noradrenalina se relacionan con infertilidad en la etapa de subfertilidad en ratas (Nugent y cols 2012). En nuestro trabajo al sobre-estimar con Isoproterenol el sistema β -adrenérgico en ratas fértiles y subfértiles, las concentraciones de noradrenalina y de receptores β -adrenérgicos no presentaron diferencias significativas, datos que concuerdan a los encontrados por Luna y cols. (2012) en ratas jóvenes fértiles. Esto sugiere la posibilidad de que una desensibilización de los receptores pudiera ocurrir frente a una exposición prolongada o repetida del agonista (Broadley 1999), como lo que se describió en el modelo de PCO inducido por VE en ratas, en que una mayor liberación de NA desde los terminales nerviosos del ovario coincide con una regulación negativa de los receptores β -adrenérgicos (Lara y cols. 1993). En este caso la pérdida de sensibilidad de los receptores o la funcionalidad de estos durante el envejecimiento ovárico requiere ser estudiada.

8. Modelos Propuestos

Ratas de 6 meses de edad con ISO

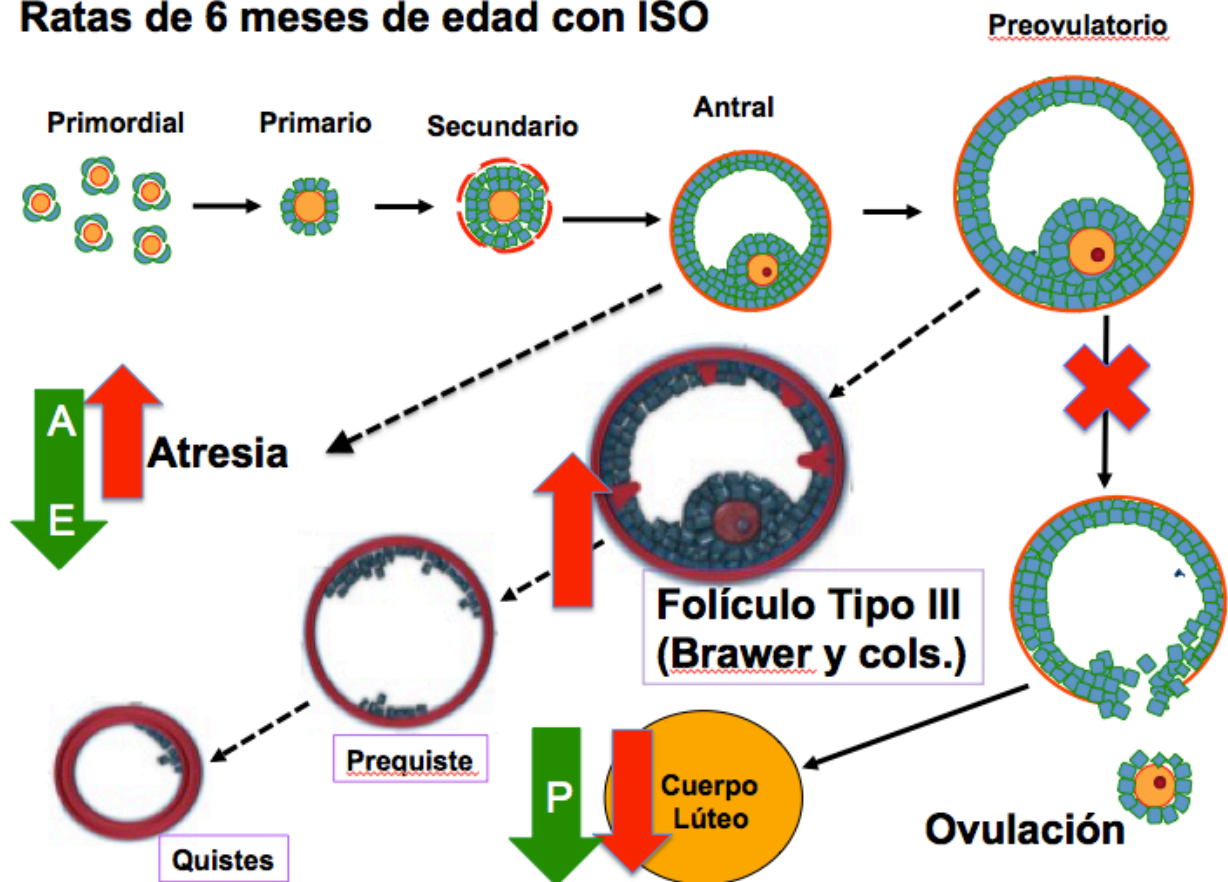


Figura 29. Ratas de 6 meses de edad tratadas con ISO. Las flechas negras continuas, indican la vía clásica de la foliculogénesis, desde el desarrollo de folículo primordial hasta un folículo preovulatorio para su ovulación y mantención de la especie, la X roja indica que el tratamiento con ISO la estaría frenando. Las flechas negras discontinuas señalan las vías alteradas de la foliculogénesis, como atresia folicular y desarrollo de estructuras quísticas. Las flechas rojas indican que el tratamiento con ISO aumentó la atresia folicular (secundarios y antrales) y disminuyó la cantidad de CL. Las flechas verdes, indican los niveles plasmáticos de las hormonas esteroidales (P, progesterona, A, androstenediona y E, estradiol).

Ratas de 10 meses edad con ISO

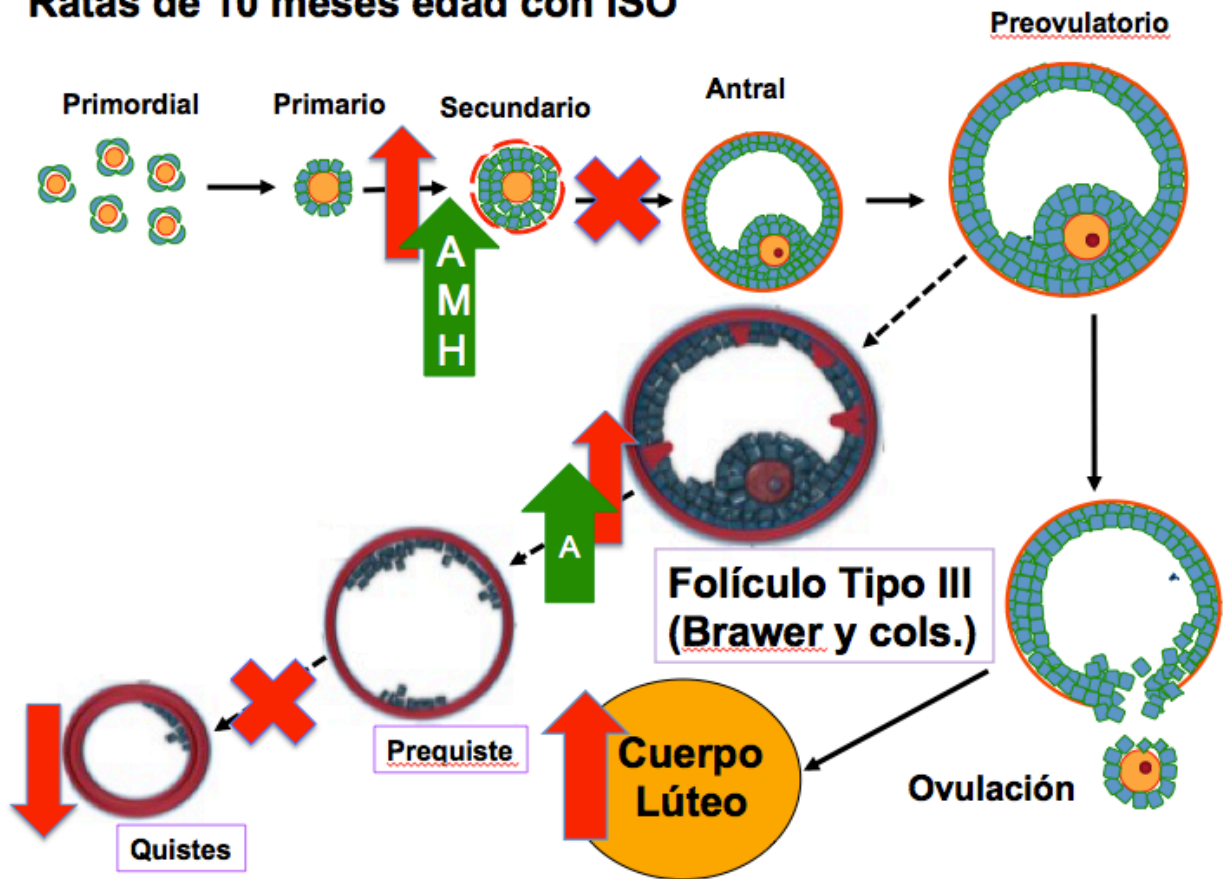


Figura 30. Ratas de 10 meses de edad tratadas con ISO. Las *fechas negras continuas*, indican la vía clásica de la foliculogénesis, desde el desarrollo de folículo primordial hasta un folículo preovulatorio para su ovulación y mantención de la especie, la *X roja* indica que el tratamiento con ISO la estaría frenando el desarrollo de folículos antrales. Las *flechas negras discontinuas* señalan el desarrollo de estructuras quísticas, la *X roja* indica que el tratamiento con ISO la estaría frenando el desarrollo de quistes foliculares. Las *flechas rojas* indican que el tratamiento con ISO: aumentó la cantidad de folículos secundarios, folículos tipo III, disminuyó la cantidad de quistes y aumento la cantidad de CL. Las *flechas verdes*, indican los niveles plasmáticos de las hormonas esteroidales y AMH, el tratamiento con ISO aumentó los niveles plasmáticos de AMH y A.

9. Conclusión

El presente trabajo sugiere que la sobre-estimulación β -adrenérgica afecta la función ovárica, indicando un adelanto del envejecimiento ovárico en ratas fértiles y contrario a lo propuesto, en ratas en periodo subfétil se observó una leve mejoría de la foliculogénesis que no es suficiente para recuperar la funcionalidad ovárica. Ambos resultados apoyan la idea que el sistema nervioso simpático tiene un rol importante en la función ovárica.

10. Proyección del trabajo

Debido a que la mujer actual está postergando su maternidad justo en el periodo que declina la fertilidad, es necesario entender cómo actúan los mecanismos de regulación endocrinos y nerviosos durante esta ventana de tiempo, para poder ayudar a una concepción efectiva.

Gracias al uso de un modelo animal, en este trabajo se concluyó que la sobre-activación de la regulación nerviosa puede alterar la morfología ovárica, envejeciendo el ovario prematuramente. Aunque es un proceso poco claro y que requiere un mayor estudio, conocer los factores que regulan la fertilidad podría ser de mucha ayuda. Se podría utilizar herramientas farmacológicas que bloquearan una sobre-activación de la vía β -adrenérgica en la ventana de fertilidad, con el objetivo de aplazar el desarrollo de estructuras quísticas o bien recuperar la funcionalidad ovárica. Esto cobra relevancia en la actualidad, donde la mujer está constantemente sometida a situaciones de estrés educacional, social, laboral, económico, etc. que alteran la funcionalidad ovárica y si a esto se suma la postergación de la maternidad hacia el periodo de subfertilidad, se agrava aún más el problema. El hecho que podamos inhibir la activación nerviosa, probablemente nos permitirá mejorar la función reproductiva.

11. Bibliografía

1. Acuña E., "Efecto de NGF y P75NTR sobre el desarrollo folicular en ratas al término del periodo reproductivo". Memoria para optar al título de Bioquímico, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, 2008.
2. Acuña E.; Fornes R.; Fernandois D.; Garrido MP.; Greiner M.; Lara HE. and Paredes AH. "Increases in norepinephrine release and ovarian cyst formation during ageing in the rat". *Reprod Biol Endocrinol* 7:64, 2009.
3. Aguado LI.; Petrovic SL.; Ojeda SR. "Ovarian beta-adrenergic receptors during the onset of puberty: characterization, distribution, and coupling to steroidogenic responses". *Endocrinology* 110:1124-1132, 1982.
4. Baarends W.M.; Uilenbroek J.T.J.; Kramer P.; Hoogerbrugge J.W.; Van Leeuwen E.C.M.; Themmen A.P.N. and Grootegoed J.A. "Anti-müllerian Hormone and Anti-Müllerian Hormone Type II Receptor Messenger Ribonucleic Acid Expression in Rat Ovaries During Postnatal, Development, the Estrous Cycles and Gonadotropin-Induced Follicle Growth". *Endocrinology* 136: 4951-4962, 1995.
5. Barria A.; Leytont V.; Ojeda S.R. and Lara H.E. "Ovarian Steroidal Response to Gonadotropins and β -Adrenergic Stimulation is Enhanced in Polycystic Ovary Syndrome: Role of Sympathetic Innervation". *Endocrinology* 133:2696-2703, 1993.
6. Bao B.; Kumar N.; Karp R.M.; Garverick H.A. and Sundaram K. "Estrogen Receptor- β Expression in Relation to the Expression of Luteinizing Hormone Receptor and Cytochrome P450 Enzymes in Rat Ovarian Follicles". *Biology Of Reproduction* 63, 1747-1755, 2000.
7. Benjamin IJ.; Jalil JE.; Tan LB.; Cho K. and Clark WA. "Isoproterenol-induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis". *Circ Res.* 65(3):657-70, 1989.
8. Brann D. W. and Mahesh V.B. "The aging reproductive neuroendocrine axis". *Steroids* 70: 73-283, 2005.
9. Brawer JR.; Munoz M. and Farookhi R. "Development of the polycystic ovarian condition (PCO) the estradiol valerate-treated rat". *Biol Reprod* 35:647-655, 1986.
10. Broekmans F.J.; Soules M.R. and Fauser B.C. "Ovarian Aging: Mechanisms and Clinical Consequences". *Endocrine Reviews* 30: 465-493, 2009.
11. Broekmans FJ.; Knauff EAH.; te Velde ER.; Macklon NS. and Fauser BC. "Female reproductive ageing: current knowledge and future trends". *Trend Endo Metab* 18:58-65, 2007.
12. Buyuk E.; Seifer D.B.; Younger J.; Grazi R.V. and Lieman H. "Random anti-Müllerian hormone (AMH) is a predictor of ovarian response in women with elevated baseline early follicular follicle-stimulating hormone levels". *Fertility and Sterility* 95(7): 2369-2372, 2011.
13. Cheung AP.; Sierra S.; AlAsiri S.; Carranza-Mamane B.; Case A.; Dwyer C.; Graham J.; Havelock J.; Hemmings R.; Lee F.; Liu K.; Murdock W.; Senikas V.; Vause TD. and Wong BC. "Advanced reproductive age and fertility". *J Obstet Gynaecol Can.*33(11):1165-75, 2011.

14. Cruz G.; Barra R., González D.; Sotomayor-Zárate R.; and Lara H. "Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats". *Fertil Steril* 98(5):1283-90, 2012.
15. de Vet A.; Laven JS.; de Jong FH.; Themmen AP. and Fauser BC. "Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging". *Fertil Steril.* 77(2):357-62, 2002.
16. Díaz, A. "El Factor de Crecimiento Neuronal favorece el envejecimiento Ovárico". Memoria para optar al título de Bioquímico, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, 2009.
17. Dissen GA.; Paredes A.; Romero C.; Dees WL. and Ojeda SR. "Neuronal and Neurotrophic Control of Ovarian Development". In: Adashi PCKLaEY ed. *The Ovary. Second Edition* ed. San Diego, California, USA: Elsevier Academic Press; 3-23, 2004.
18. Dissen G. A.; Lara H. E.; Leyton V.; Paredes A.; Hill D. F.; Costa M. E.; Martinez-Serrano A. and Ojeda S. R. "Intraovarian Excess of Nerve Growth Factor Increases Androgen Secretion and Disrupts Estrous Cyclicity in the Rat". *Endocrinology* 141(3): 1073-82, 2000.
19. Dorfman M.; Arancibia S.; Fiedler J.L. and Lara H.E. "Chronic Intermittent Cold Stress Activates Ovarian Sympathetic Nerves and Modifies Ovarian Follicular Development in the Rat". *Biology of Reproduction* 68, 2038–2043, 2003.
20. Ennis IL.; Escudero EM.; Console GM.; Camihort G.; Gomez DC.; Seidler RW.; Camilión de Hurtado MC. and Cingolani HE. "Regression of Isoproterenol-Induced Cardiac Hypertrophy by Na⁺/H⁺ Exchanger Inhibition". *Hypertension.* 41:1324-1329, 2003.
21. Ferandois D.; Lara H. E. and Paredes A. H. "Blocking of β -Adrenergic Receptors During The Subfertile Period Ihibits Spontaneous Ovariab Cyst Formation In Rats". *Horm Metab Res* 44(9):682-7:1-6, 2012.
22. Fernandois D. Bloqueo farmacológico de los receptores β -adrenérgicos en ratas en el periodo de subfertilidad. Tesis para optar al grado académico de Magíster en Bioquímica y Memoria para optar al Título de Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, 2011.
23. Florez J. "Farmacología Humana". 3ra ed. Barcelona, España: Masson S.A., 1998.
24. Gerendai I.; Kocsis K. and Halasz B. "Supraspinal connections of the ovary: structural and functional aspects". *Microsc Res Tech* 59:474-483, 2002.
25. Greenwald G. and Roy S. "Follicular development and its control". In: Knobil E, Neill J, editors. *The Physiology of Reproduction.* 2nd edition. New York Raven Press. 629–725, 1994.
26. Gougeon A. "Dynamics of Human Follicular Growth: Morphologic, Dynamic, and Functional Aspects". Elsevier. *The Ovary (2dn Edition)* 25-38, 2004.
27. Guyton A. C. and Hall J. E. "Tratado de Fisiología Médica". Mc Graw-Hill Interamericana novena edición, capítulo 81, 1997.
28. Heider U.; Pedal I. and Spanel-Borowski K. "Increase in nerve fibers and loss of mast cells in polycystic and postmenopausal ovaries". *Fertility and Sterility* 75(6): 1141-1147, 2001.

29. Kedem A., Yung Y., Yerushalmi G.M., Haas J., Maman E., Hanochi M., Hemi R., Orvieto R., Dor J. and Hourvitz A. "Anti Müllerian Hormone (AMH) level and expression in mural and cumulus cells in relation to age". *Journal of Ovarian Research* 7:113, 2014.
30. Kermath B.A. and Gore A.C. "Neuroendocrine Control of the Transition to Reproductive Senescence: Lessons Learned from the Female Rodent Model". *Neuroendocrinology* 96:1–12, 2012.
31. Lara H.E.; Ferruz J. L.; Luza S.; Bustamante D.A.; Borges Y. and Ojeda S. "Activation Of Ovarian Sympathetic Nerves In Polycystic Ovary Syndrome". *Endocrinology* 133(6):2690-5, 1993.
32. Lara H.E.; Dissen G.A.; Leyton V.; Paredes A.; Fuenzalida H.; Fiedler J.L. and Ojeda S.R. "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* 141:1059-1072, 2000.
33. Luna S.L.; Neuman S.; Aguilera J.; Brown D.I. and Lara H.E. In Vivo β -Adrenergic Blockade by Propranolol Prevents Isoproterenol-induced Polycystic Ovary in Adult Rats. *Horm. Metab. Res.* 44 (9): 676-8, 2012.
34. Luna S.L. "Desarrollo y Mantenimiento de Ovario Poliquístico en Rata por Sobrestimulación Adrenérgica". Tesis para optar al Grado de Doctor en Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile, 2013.
35. Marcondes F.K.; Bianchi F.J. and Tanno A.P. "Determination of the Estrous Cycle Phases of Rats: Some Helpful Considerations". *Braz. J. Biol.*, 62(4A): 609-614, 2002.
36. Martínez J. "Neonatal exposure to estradiol reprograms the expression of androgen receptor and anti-müllerian hormone: short and long term effects and their relation to the polycystic ovary phenotype" Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado académico de Doctor en Bioquímica, 2014.
37. Mcgee E.A. and Hsueh A.J.W. "Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles". *Endocrine Reviews* 21(2): 200–214, 2000.
38. Neumann S. "Inducción de Ovario Poliquístico en ratas por estimulación adrenérgica". Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico. Escuela de Química y Farmacia. Facultad de Medicina. Universidad de Valparaíso, 1997.
39. Nugent BM.; Tobet SA.; Lara HE.; Lucion AB.; Wilson ME.; Recabarren SE. and Paredes AH. "Hormonal Programming across the Lifespan". *Horm Metab Res* 2012; 44:1–10, 2012.
40. Ojeda SR. and Skinner MK. "Puberty in the Rat". *Physiology of the Reproduction*. Elsevier Inc. Chapter 38: 2061-2126, 2006.
41. Paredes A.; Gálvez A.; Leyton V.; Aravena G.; Fiedler J.L.; Bustamante D. and Lara H.E. "Stress Promotes Development of Ovarian Cysts in Rats, The Possible Role of Sympathetic Nerve Activation". *Endocrine* 8(3): 309–315, 1998.
42. Pellatt L.; Rice S. and Mason HD. "Anti-Müllerian hormone and polycystic ovary syndrome: a mountain too high?". *Society for Reproduction and Fertility*. 139: 825–833, 2010.

43. Sanz-Rosa D. "Revisión: los receptores β adrenérgicos en la enfermedad cardiovascular". *Hipertens riesgo vasc.* 28(2):55-62, 2011.
44. Sotomayor-Zárate R.; Dorfman M.; Paredes A. and Lara H.E. "Neonatal Exposure to Estradiol Valerate Programs Ovarian Sympathetic Innervation and Follicular Development in the Adult Rat". *Biology Of Reproduction* 78, 673–680, 2008.
45. Staley K. and Scharfman H. "A woman's prerogative". *Nature Neuroscience, News And Views* 8(6): 687-698, 2005.
46. Sverrisdóttir Y.B.; Mogren T.; Kataoka J.; Janson P.O. and Stener-Victorin E. "Is polycystic ovary syndrome associated with high sympathetic nerve activity and size at birth?". *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E576–E581, 2008.
47. Swanton A. and Child T. "Reproduction and ovarian ageing". *Journal of the British Menopause Society* 11(4): 126-131, 2005.
48. Vantman D. and Vega M. "Fisiología Reproductiva y Cambios Evolutivos con la Edad de la Mujer" *Rev. Med. Clin. Condes* 21(3): 348 – 362, 2010.
49. Velázquez J. A. and Mendieta E. "Desarrollo folicular". Sitio web: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros98/folicular.htm> 2012.
50. Wilkosz P.; Greggains G.D.; Tanbo T.G. and Fedorcsak P. "Female Reproductive Decline Is Determined by Remaining Ovarian Reserve and Age. *PLoS One*. 2014 Oct 13;9(10):e108343. doi: 10.1371/journal.pone.0108343. eCollection, 2014.