

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***EL FACTOR DE CRECIMIENTO NEURONAL
(NGF) ES UN ACTIVADOR DUAL DE LOS
SISTEMAS COLINÉRGICO Y NORADRENÉRGICO
DEL OVARIO DE RATA***

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

AGUSTÍN OSVALDO BENÍTEZ SIERRA

Director de Tesis: Dr. Hernán Lara Peñaloza

Santiago-CHILE

Noviembre 2021

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

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

AGUSTÍN OSVALDO BENÍTEZ SIERRA

**Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito
para optar al Grado de Doctor en Farmacología, en el examen de defensa
de Tesis público rendido el día de del 2021.**

Director de Tesis:

Dr. Hernán Lara P.

Comisión Informante de Tesis:

Dra. Jenny L. Fiedler (Presidente)

Dra. Carmen Romero O.

Dr. Enrique Castellón V.

Dra. Katia Gysling C.

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto de tesis terminado fue producto del encuentro del trabajo arduo diario con un sinnúmero de problemas y situaciones que hicieron única la experiencia del postgrado. En este sentido, estoy agradecido de todas las personas que desde un principio influyeron y me apoyaron para realizar mis estudios de postgrado, junto con los que se fueron agregando y que me acompañaron durante todo el desarrollo de este proyecto:

A mis ex-compañeros de trabajo: Patricio, Giselle, Beatriz y Fidel, quienes me apoyaron durante mi postulación.

A mis compañeros del programa: Carlos, Andrea, Frenshi y Peter: con quienes viví juntos el primer año del doctorado, sufrimos con las interrogaciones de cada curso y celebramos (*cuando correspondía*) los finales de semestre. En particular, Frenshi, con quien además compartí laboratorio y desarrollamos una paciencia mutua, siendo importante en el desarrollo de la tesis; y Peter, un maestro y bullanguero.

A mis compañeros de laboratorio: Cony, Sara, Miguel, Cuchara y Raulsín: con quienes compartí mis años en el laboratorio, fueron parte del desarrollo de mi tesis y unos excelentes compañeros. En particular, Cuchara y Raulsín, quienes fueron un alivio en los momentos difíciles y cuya amistad espero que se prolongue por años.

Al Profe Pocho, quien me enseñó las bases de lo que hoy es parte fundamental de mi trabajo: RT-qPCR. Además, un apoyo académico fundamental durante todo mi trabajo en el laboratorio.

A mi tutor, Dr. Hernán Lara, un maestro en el área de la neuroendocrinología y que, a través de métodos poco ortodoxos, sabe cómo guiar a cada uno de sus pupilos a ser un mejor estudiante, profesional-académico y persona. Recomendadísimo para cualquier estudiante que quiera una formación integral y guiada por el conocimiento.

A CONICYT, que sea como sea, sin el financiamiento otorgado por la Beca, no hubiera sido posible el desarrollo de mis estudios de postgrado.

A mi primo Alejandro, quien desde siempre ha estado a mi lado para poder hablar y distraerme, con uno que otro consejo ocasional.

Mi pareja, Michel, quien ha sabido comprenderme desde hace tiempo y quien me ha apoyado desde el primer momento en este y otros proyectos. Su compañía fue un alivio en los días difíciles.

Y finalmente, a mi familia: Sergio, Vilma, Marcia y Claudia, junto con los nenes Pablo, Cristóbal, Rosario y Mateo, quienes me acompañaron de principio a fin durante mis estudios, aun cuando muchas veces no hayan entendido mis decisiones. Contar con su apoyo incondicional fue un sustento fundamental en los momentos difíciles.

FINANCIAMIENTO

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

- Proyecto FONDECYT: N°1170291. Investigador Responsable: Dr. Hernán Lara Peñaloza.
- Beca de apoyo a la realización de tesis doctoral Conicyt N°21161218 – Becario Agustín Benítez Sierra.
- Beca de rebaja de arancel de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile

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

PRESENTACIONES A CONGRESOS

– Participación en el International Workshop in Neuroendocrinology

4th International Workshop in Neuroendocrinology, Hippocampus Resort – Concón, 6 al 9 de agosto 2017: “CHANGES IN CHOLINERGIC NEURONAL MARKERS IN THE RAT OVARY AFTER THE CHRONIC EXPOSURE TO COLD-STRESS”, presentación de póster.

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

XXXIX Reunión Anual de la SOFARCHI, Hotel Cabaña del Lago - Puerto Varas, 22 al 25 de noviembre 2017: “CAMBIOS FUNCIONALES EN LOS NIVELES DE ACETILCOLINA Y DE LA ACTIVIDAD ACETILCOLINESTERASA EN OVARIO DE RATA POR EFECTO DEL ESTRÉS, presentación oral dentro del simposio “NEURAL AND NON-NEURONAL FUNCTIONS OF ACETILCHOLINE IN NEUROENDOCRINE TISSUES”.

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

18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology. Kyoto International Conference Center – Kyoto, Japan, 1 al 7 de Julio 2018: “CHRONIC COLD STRESS PRODUCES AN INCREMENT IN ACETYLCHOLINE LEVELS AND CHOLINESTERASE ACTIVITY IN RAT OVARY”, presentación de póster.

– Presentación en la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo (SCHR D)

XXX Reunión Anual de la SCHR D, parte del Congreso Latino Americano Conjunto de Reproducción, Hotel Plaza El Bosque – Santiago, 12 al 14 de Septiembre 2019: “NGF INCREASED CHOLINE ACETYL TRANSFERASE AND THE VESICULAR TRANSPORTER FOR ACETYLCHOLINE EXPRESSION IN RAT OVARY EX VIVO”, presentación de póster. Premio a la mejor presentación de poster de SCHR D.

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

XLI Reunión Anual de la SOFARCHI, Universidad de Concepción - Concepción, 04 al 08 de noviembre 2019: “NGF INCREASED CHOLINE ACETYL TRANSFERASE AND THE VESICULAR ACETYLCHOLINE TRANSPORTER EXPRESSION IN RAT OVARY EX VIVO”, presentación de póster.

– Presentación en la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo (SCHR D)

XXXI Reunión Anual Virtual de la SCHR D - 02 al 03 de Octubre 2020: “NERVE GROWTH FACTOR AS A REGULATOR OF AUTONOMIC NERVOUS SYSTEM IN

OVARIAN FUNCTION.”, charla inaugural como ganador del premio a la mejor presentación de poster de la XXX Reunión Anual de la SCHR.D.

PUBLICACIONES

Parte de los resultados de esta tesis han dado origen a un artículo científico publicado en la revista *Frontiers in Endocrinology*, cuyo Factor de impacto ISI es 5,555 a abril de del 2021.

“Nerve Growth Factor: A Dual Activator of Noradrenergic and Cholinergic Systems of the Rat Ovary”

Agustin Benitez¹, Raúl Riquelme¹, Miguel del Campo¹, Camila Araya¹ and Hernán E. Lara¹

Front. Endocrinol., 25 February 2021. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.636600>

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

INDICE

INDICE DE FIGURAS.....	<i>xi</i>
INDICE DE TABLAS.....	<i>xii</i>
ABREVIACIONES	<i>xiii</i>
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. El ovario y su inervación.....	3
1.2. Acetilcolina y el sistema colinérgico en ovario de rata	4
1.3. Efectos tróficos de agonistas muscarínicos en el ovario.	6
1.4. Factores que regulan el sistema colinérgico en ovario.....	8
1.5. Efectos de NGF en el desarrollo folicular y su relación con el sistema colinérgico.....	8
1.6. Estrés crónico y PCO	11
1.7. Objetivo de este trabajo.....	12
2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	13
2.1. Hipótesis.....	13
2.2. Objetivo General.....	13
2.3. Objetivos específicos.....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1. Animales y diseño experimental	14
3.2. Estudios de denervación e incremento endógeno de NGF.....	15
3.3. Estudios de administración in vivo de NGF y carbacol.....	16
3.4. Estudios in vitro de NGF.....	17
3.5. Reacción de la polimerasa en cadena en tiempo real (RT-qPCR)	18
3.6. Análisis Western Blot.....	18
3.7. Análisis por Inmunohistoquímica	19
3.8. Cuantificación de los niveles intraováricos de ACh y actividad de ACHE.....	20
3.9. Cuantificación de los niveles NGF por ELISA	20
3.10. Análisis morfométrico	20
3.11. Niveles plasmáticos de hormonas esteroideas.	21
3.12. Análisis estadístico	21
4. RESULTADOS	23
4.1. Caracterización de ChAT en ovario de rata	23

4.1.1.	<i>Implementación de determinación de ARNm de ChAT por RT-PCR semicuantitativo.....</i>	23
4.1.2.	<i>Implementación de western blot y técnica inmunohistoquímica para proteína ChAT</i>	24
4.1.3.	<i>Estudio del sistema colinérgico en la rata prepúber y púber</i>	27
4.2.	<i>Efectos en el sistema colinérgico del tratamiento in vivo con NGF</i>	30
4.2.1.	<i>Aumento de NGF mediado por EV</i>	30
4.2.2.	<i>Aumento de NGF por denervación quirúrgica y farmacológica</i>	30
4.2.2.1.	<i>Denervación quirúrgica de nervio ovárico superior (SONX)</i>	30
4.2.2.2.	<i>Denervación farmacológica con guanetidina.....</i>	31
4.3.	<i>Tratamiento farmacológico in vivo con 100 ng/mL de NGF.....</i>	32
4.4.	<i>Efectos de tratamiento in vitro con NGF</i>	35
4.5.	<i>Efecto del aumento de NGF y disminución de ACh en la función ovárica</i>	35
4.6.	<i>Efecto de carbacol en el sistema colinérgico ovárico.....</i>	38
5.	<i>DISCUSIÓN.....</i>	40
5.1.	<i>Determinación de ARNm de ChAT mediante RT-qPCR y la distribución de la proteína de ChAT en el ovario de rata.....</i>	40
5.2.	<i>Efecto de NGF sobre los niveles de ACh intraováricos.....</i>	43
5.2.1.	<i>Valerato de estradiol (EV) induce un aumento de ACh</i>	44
5.2.2.	<i>El tratamiento in vivo con NGF reduce los niveles de ACh y potencia la producción de la isoforma 55 kDa de ACHE</i>	44
5.3.	<i>NGF aumentó el ARNm de ChAT y VACHT pero no la producción de ACh in vitro. 46</i>	
5.4.	<i>El desbalance del sistema colinérgico intraovárico y la vía simpática sobre-activada debido al exceso de NGF intraovárico produce una dinámica folicular alterada.....</i>	47
5.5.	<i>Nuestros resultados en el contexto conocido de NGF y el sistema colinérgico: el rol dual de NGF.....</i>	50
6.	<i>CONCLUSIONES.....</i>	532
7.	<i>REFERENCIAS</i>	53

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1: Amplificación ARNm de ChAT.</i>	23
<i>Figura 2: Niveles de ChAT en células de la teca e intersticio celular; y en células de la granulosa (CGs).</i>	24
<i>Figura 3: Determinación de ChAT por western blot con anticuerpo anti-ChAT Santa Cruz.</i>	24
<i>Figura 4: Determinación de ChAT por western blot en muestra de rata con anticuerpo anti-ChAT de Sigma.</i>	25
<i>Figura 5: IHQ para ChAT con anticuerpo Sigma.</i>	26
<i>Figura 6: Estudio de sistema colinérgico en la pubertad de la rata Sprague Dawley.</i>	28
<i>Figura 7 Inmunoreactividad positiva para anticuerpo anti-ChAT.</i>	29
<i>Figura 8: Efecto del EV en la ACh ovárica.</i>	30
<i>Figura 9: Efectos de la denervación SONX en NA, NGF y ACh en ovario de rata.</i>	31
<i>Figura 10: Efectos de la denervación química con guanetidina (GD) en NA, NGF, ACh y ACHE en ovario de rata.</i>	32
<i>Figura 11: La administración in vivo de NGF intraovárico aumenta los niveles de TH y disminuye la acetilcolina.</i>	SW33
<i>Figura 12: Análisis por western blot reveló que la isoforma de 55 kDa de ACHE aumenta luego del tratamiento in vivo con NGF.</i>	34
<i>Figura 13: Incubación in vitro de NGF aumenta ARNm de ChAT y VACHT pero disminuye la ACh en el medio.</i>	35
<i>Figura 14: La ciclicidad estral fue afectada por una administración in vivo de NGF.</i>	36
<i>Figura 15: Análisis morfométrico de los ovarios después de la exposición intrabursal durante 28 días con 100 ng/mL de NGF.</i>	37
<i>Figura 16: Efectos de NGF en el tamaño de los cuerpos lúteos.</i>	38
<i>Figura 17: Efectos del tratamiento in vivo con carbacol en el sistema colinérgico ovárico.</i>	39
<i>Figura 18: Apariencia morfológica de los ovarios tratados con 100 ng/mL de NGF o 100 μM de carbacol durante 28 días.</i>	39
<i>Figura 19: Resumen de los resultados obtenidos.</i>	50
<i>Figura 20: ACh se produce principalmente dentro del ovario y su producción es estimulada por NGF vía ChAT.</i>	51

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1: Grupos experimentales usados para el estudio de los efectos de NGF en el sistema colinérgico intraovárico por medio de la incubación in vitro y la administración in vivo de NGF o carbacol por el uso de una minibomba osmótica.</i>	15
<i>Tabla 2: Partidores usados para la amplificación de PCR.....</i>	18
<i>Tabla 3: Concentración plasmática de progesterona, androstenediona, testosterona, y estradiol después tratamiento NGF.....</i>	38

ABREVIACIONES

ACh	Acetilcolina
ACHE	Acetilcolinesterasa
ARNm	ARN mensajero
CGs	Células de la Granulosa
ChAT	Colina acetiltransferasa
CRAT	Carnitina acetiltransferasa
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
EV	Valerato de Estradiol
FSH	Hormona Folículo-Estimulante
GD	Guanetidina
GnRH	Hormona Liberadora de Gonadotropinas
hCG	Gonadotropina Coriónica humana
IHQ	Inmunohistoquímica
i.m. / i.p.	Intramuscular/Intraperitoneal
LH	Hormona Luteinizante
mAChR	Receptores Muscarínicos
M1/M3/M5	Receptor Muscarínico subtipo-1/ 3 / 5
NA	Noradrenalina
nAChR	Receptores Nicotínicos
PCOS	Síndrome del Ovario Poliquístico
NGF	El Factor de Crecimiento Nervioso
NOS	Nervio Ovárico Superior
NPO	Nervios del Plexo Ovárico
RT-qPCR	Transcripción Reversa-PCR en Tiempo Real
SONX	Delección quirúrgica del NOS
TH	Tirosina Hidroxilasa
Tm	Temperatura de fusión
ULO	Hemi-Ovariectomía Unilateral

VACHT Transportador Vesicular de ACh

WB Western Blot

RESUMEN

La evidencia experimental sugiere que la función ovárica es controlada por el sistema nervioso simpático, regulando la secreción de esteroides, el desarrollo folicular y la ovulación. Publicaciones recientes apoyan la presencia de un sistema colinérgico intraovárico que se localiza principalmente en las células de la granulosa, y está involucrado en el desarrollo de los folículos ováricos y por lo tanto en la ovulación. Interesantemente, se ha sugerido que el estrés simpático como la exposición crónica al frío activa, el sistema simpático y colinérgico. Sin embargo, no se sabe cuál es la principal señal que podría activar ambos sistemas. El factor de crecimiento nervioso (NGF) promueve el crecimiento y diferenciación de las neuronas colinérgicas en el sistema nervioso central, pero la información en el ovario es limitada. El principal objetivo de este trabajo es estudiar si NGF promueve la activación del sistema colinérgico intraovárico. Inicialmente, exploramos el sistema colinérgico en ratas en edad peripuberal y adultas. Luego, ratas adultas fueron tratadas con valerato de estradiol para desarrollar el fenotipo de ovario poliquístico y encontramos un aumento en los niveles de noradrenalina y acetilcolina a través de un mecanismo mediado por NGF. De hecho, la exposición intraovárica *in vivo* de las ratas adultas a NGF por 28 días, aumentó las enzimas tirosina hidroxilasa y la acetilcolinesterasa, sugiriendo que el incremento de acetilcolina fue atenuado por el aumento de la enzima que degrada al neurotransmisor. La exposición *in vitro* del ovario prepuberal con 100 ng/mL de NGF durante 3 hrs aumentó tanto la enzima colina acetiltransferasa como el transportador vesicular de acetilcolina, pero solo indujo un incremento modesto en la acetilcolina. El tratamiento *in vivo* disminuyó los niveles de acetilcolina, aparecieron quistes ováricos y disminuyó el número de cuerpos lúteos. En efecto, las ratas adultas tratadas con carbacol (agonista colinérgico) durante 28 días, disminuyeron los quistes y aumentaron los cuerpos lúteos. Con todo esto, demostramos que NGF también regula el sistema colinérgico ovárico y lo postulamos como un regulador principal del control autonómico dual. Además, determinamos que la acetilcolina, a través de los receptores muscarínicos promueven el desarrollo folicular *in vivo*, sugiriendo que el tratamiento con agonistas colinérgicos muscarínicos, podría ser un enfoque terapéutico para tratar patologías ováricas que afecten el desarrollo folicular.

ABSTRACT

Strong evidences suggest that the ovary function is controlled by the sympathetic nervous system regulating steroid secretion, follicular development and ovulation. Recent evidence supports the presence for an intraovarian cholinergic system mainly located in granulosa cells, and involved in the development of ovarian follicles and hence in ovulation. Interestingly, it has been suggested that sympathetic stress as chronic exposure to cold, activates ovarian sympathetic and cholinergic systems. However, it is not known which the primary signal that could activate both systems is. The nerve growth factor (NGF) promoted cholinergic neurons growth and differentiation in the central nervous system but in the ovary only limited information exist. The main aim of this work is to study if NGF promotes the activation of the intraovarian cholinergic system. Initially, we explored intraovarian cholinergic system in peripuberal and adult rats. Then, adult rats were treated with estradiol valerate to develop a polycystic ovary phenotype and we found increased ovarian norepinephrine and acetylcholine levels through a NGF mediated mechanism. In fact, chronic intraovarian exposure of adult rats for 28 days to NGF increased the tyrosine hydroxylase enzyme and acetylcholinesterase, suggesting that the increase of acetylcholine was attenuated by the increase of the metabolic enzyme. *In vitro* exposure of the prepuber ovary with 100 ng/ml of NGF during 3 hours increased both choline acetyltransferase enzyme and vesicular acetylcholine transporter expression but only a modest increase in acetylcholine. *In vivo* NGF intraovarian administration produced the appearance of follicular cyst and a decrease in the corpora lutea number, through the decrease in acetylcholine levels. Indeed, adults rats treated with carbachol during 28 days had a decreased number of follicular cysts and increased the number of corpora lutea. All together, we demonstrated that NGF also regulates ovarian cholinergic system and we postulated it as a main regulator of the dual autonomic control. Besides, we determined that acetylcholine, through muscarinic receptor promotes *in vivo* follicular development, suggesting that muscarinic cholinergic agonist could be a therapeutic treatment for the ovarian pathologies affecting follicular development.

1. INTRODUCCIÓN

Diversos estudios han mostrado que la función ovárica es controlada por el sistema nervioso simpático, regulando la secreción de esteroides, desarrollo folicular y ovulación (Lara et al., 2002). El sistema nervioso simpático se comunica con el ovario a través de dos vías: el nervio del plexo ovárico (NPO), que inerva principalmente las arterias que irrigan al ovario; y el nervio ovárico superior (NOS), que se ubica sobre el ligamento suspensorio, se ha visto en cercanía anatómica a los folículos en crecimiento, particularmente en contacto con células de la teca (Gerendai et al., 2002; Lawrence and Burden, 1980). Además, se ha descrito la presencia de terminales del nervio vago inervando solamente los vasos sanguíneos del órgano (Burden, 1978; Gerendai et al., 2000). Evidencia reciente ha demostrado la presencia de un sistema colinérgico intraovárico localizado en células de la granulosa (CGs) y está involucrado en el desarrollo de los folículos, la ovulación y la atresia de los folículos antrales (Cruz et al., 2015; Riquelme et al., 2019; Urra et al., 2016). Más recientemente, se ha descrito que un aumento crónico intraovárico de acetilcolina (ACh), por medio del tratamiento con Huperzina (un inhibidor de colinesterasas), recupera la función ovárica de las alteraciones provocadas por estrés crónico (Riquelme et al., 2021). A pesar del conocimiento que se ha alcanzado en el área, se desconoce qué factores endógenos regularían la producción intraovárica de acetilcolina. El factor de crecimiento nervioso (NGF) fue el primer factor neurotrófico encontrado que regula las funciones ováricas de las neuronas noradrenérgicas que inervan el órgano, y recientemente se ha visto en modelos *in vitro* de células de mono *Rhesus* y humano que induce un incremento en la proteína colina acetiltransferasa (ChAT). En este proyecto se planteó estudiar la relación del NGF con el sistema colinérgico no neuronal del ovario de la rata, que podría llevar a un aumento del contenido de acetilcolina intraovárico. Además, a pesar de que ya se conocen los efectos de NGF sobre el desarrollo folicular (tanto a corto como largo plazo), hasta ahora no se ha estudiado si tales procesos podrían ser mediados vía la estimulación del sistema colinérgico intraovárico. En este trabajo presentamos información de un mecanismo neurotrófico común actuando en las neuronas noradrenérgicas y en las células productoras de ACh para balancear el tono autonómico y mantener la homeostasis del órgano.

1.1. ***El ovario y su inervación***

El ovario es un órgano endocrino par e intraabdominal, que está compuesto de folículos, una unidad funcional y anatómica compleja que se compone de células de la teca en su parte más externa, separada por una membrana basal de las CGs que rodean al ovocito. Durante el desarrollo folicular, los folículos tienen distintos cambios

a nivel bioquímico y morfológico, y dependiendo del estado de desarrollo de cada folículo se denominan folículos preantrales (primordiales, primarios y secundarios) y folículos antrales (sanos y atrésicos) (Leung and Adashi, 2004). Los folículos periovulatorios pueden ser seleccionados para liberar el ovocito, y los remanentes celulares van a formar el denominado cuerpo lúteo. Los folículos antrales que no alcanzan la maduración suficiente en cada ciclo van a sufrir atresia (Leung and Adashi, 2004). Además, se han descrito que en condiciones patológicas, tales como estrés crónico, se produce la promoción de estructuras quísticas, tales como folículos tipo III y quistes (Bernuci et al., 2013).

El ovario tiene dos funciones fundamentales: la gametogénica, para producir un óvulo funcional capaz de ser fecundado; y la endocrina, basada en la producción de distintos esteroides, tales como progesterona, testosterona y estradiol (Leung and Adashi, 2004). Inicialmente, se describió que estas funciones son reguladas por señales de origen central, mediado por el eje hipotálamo/hipófisis anterior, en donde la secreción de GnRH promueve la liberación de las gonadotropinas (FSH y LH); y a nivel periférico, por el sistema nervioso autónomo y por factores producidos localmente, tales como el NGF (detalles más abajo) (Leung and Adashi, 2004). Más tarde, se describió la regulación autonómica del ovario, donde participa el componente simpático del sistema autónomo en la inervación ovárica, a través del NPO y del NOS (Lawrence and Burden, 1980). Las fibras del NOS se localizan alrededor de los folículos y regulan la secreción de esteroides y el desarrollo folicular; mientras que las del nervio del plexo ovárico transcurre a lo largo del ligamento suspensorio del ovario y alcanza principalmente los vasos sanguíneos que irrigan el órgano (Gerendai et al., 2002; Lawrence and Burden, 1980). Tanto los neurotransmisores como neuropéptidos liberados desde los terminales nerviosos tienen participación de distintas funciones ovárica, destacando la noradrenalina que regula funciones tales como la esteroidogénesis y el desarrollo folicular (Lara et al., 2000; Lara et al., 1993; Lara et al., 1990c; Mayerhofer, 1997). Más recientemente, se ha descrito la participación de otro neurotransmisor en la regulación de las funciones ováricas, pero a diferencia de la noradrenalina, se sintetiza directamente en el ovario: la ACh.

1.2. Acetilcolina y el sistema colinérgico en ovario de rata

La ACh es un neurotransmisor cuya síntesis se realiza en un solo paso mediado por la colina acetiltransferasa (ChAT), que a partir de acetil-CoA cataliza la adición de un acetato a la colina. En neuronas colinérgicas y algunas células no neuronales se ha observado la existencia de almacenamiento vesicular del

neurotransmisor mediado por el transportador vesicular (VAChT), el que por un sistema de antiporter de protones permite el ingreso y su almacenamiento (Rang et al., 2016). Una vez que es liberada al medio, ACh puede unirse a sus receptores: nicotínicos (nAChR), que son canales iónicos; y muscarínicos (mAChR), pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteína G (Rang et al., 2016); en el medio extracelular es degradado por la acetilcolinesterasa (ACHE) y otras colinesterasas, tales como la butirilcolinesterasa hepática, a acetato y colina. Ésta última es el sustrato limitante para la síntesis del neurotransmisor, y se ha visto la presencia de un transportador de membrana (ChT1) que permite su recaptura.

En ovario de rata, la primera descripción relacionada a inervación colinérgica proviene del trabajo de Burden y Lawrence (Burden, 1978), quienes por medio de técnicas histoquímicas describieron neuronas ACHE positivas que corresponderían a fibras colinérgicas asociadas a fibras de origen simpático y vagal, que llegan al órgano junto al NPO, rodeando los vasos sanguíneos del órgano. Gerendai en tanto, utilizando la técnica de trazado viral transneuronal, describió una vía multisináptica entre el cerebro y el ovario, la que se conectaba a través del nervio vago, proponiendo la existencia de una vía neuronal directa de comunicación e independiente de la hipófisis (Gerendai et al., 2000).

Sin embargo, Fritz y colabs. no identificaron neuronas inmunoreactivas para anticuerpos contra la enzima ChAT inervando los folículos o alguna otra parte del ovario (Fritz et al., 1999; Fritz et al., 2001). Interesantemente, sí observaron que ChAT está presente en CGs, con una fuerte inmunoreacción en los folículos antrales grandes de distintos mamíferos (rata, mono *Rhesus*, humano). Los autores reportaron que a pesar de haber usado partidores previamente publicados, no pudieron determinar la presencia de ARNm de ChAT en CGs humana por medio de RT-PCR, con lo que planteraron la posibilidad de que en el ovario existiría un corte y empalme alternativo (*splice variant* en inglés). Los resultados para ChAT en células no neuronales en ovario fueron corroborados en células luteales bovinas (Al-Zi'abi et al., 2009). Respecto a la rata, nuestro modelo de interés, también se ha descrito que en el ovario se expresan los ARNm de las isoformas -R y -S de ACHE, así como la proteína ACHE (Urrea et al., 2016). En ratón y humano se ha descrito que la isoforma R tiene un tamaño aprox. de 55 kDa, mientras que para la -S varía entre 55 a 70 kDa (García-Ayllón et al., 2012; Gilboa-Geffen et al., 2007; Montenegro et al., 2017; Silveyra et al., 2008). Esto último no ha sido evaluado en rata, por lo que no se puede confirmar el tamaño molecular para tal isoforma. Además, estudios recientes de nuestro laboratorio confirman la presencia de distintos subtipos de receptores muscarínicos (M1R, M3R y

M5R) en el ovario de ratas Sprague Dawley por medio de RT-qPCR y western blot (proyecto de tesis de Doctorado de PhDC Andrés Azocar, no publicado), similar a lo observado en ovario de mono *Rhesus* distribuidos en el ovocito y células de la granulosa (Fritz et al., 2001). En particular, Cruz y cols observaron inmunoreacción positiva al M1R en células de la teca (Cruz et al., 2015). Sin embargo en nuestro laboratorio no se han podido reproducir tales resultados (trabajo preliminar PhDC Fernanda Cuevas, no publicado). Finalmente, tal como en humano, en ovario de rata no se ha determinado la presencia de ARNm de ChAT para la síntesis de ACh. Tampoco se ha descrito la presencia de la proteína VACHT ni menos del almacenamiento vesicular del neurotransmisor.

Ya que parece poco factible que la acetilcolina, una molécula lábil y de vida media corta, pueda difundir desde los vasos sanguíneos hacia los folículos sin ser hidrolizada por las esterasas plasmáticas y locales, es que se considera que el sistema colinérgico intraovárico no neuronal sería la fuente principal de la ACh que tiene efectos intraováricos (Urra et al., 2016). Además, debido a la proximidad de los sitios de síntesis y recepción de ACh en el ovario, la regulación colinérgica actuaría de un modo autocrino y/o paracrino sobre la función ovárica, formando parte de un sistema colinérgico no neuronal, similar a lo observado, por ejemplo, en placenta y piel (Kurzen et al., 2007; Wessler et al., 2003). Tal es la evidencia que han demostrado tanto los estudios *in vitro* como *in vivo*.

1.3. Efectos tróficos de agonistas muscarínicos en el ovario

Se ha demostrado en estudios *in vitro* que la activación de los receptores muscarínicos tiene efectos tróficos en cultivos primarios de CGs y de células luteales, de humano y bovino, respectivamente (Al-Zi'abi et al., 2009; Fritz et al., 1999; Fritz et al., 2002). Estos efectos se tradujeron en un incremento en la proliferación de las células en cultivo y, en el caso de las células luteales, aumento de la secreción de progesterona. Además, la activación de los receptores muscarínicos con carbacol (100 μ M) en células de la granulosa luteinizadas humanas induce la fosforilación de la conexina 43, rompe las uniones estrechas (en inglés *gap junction*) y altera la interacción célula-célula. (Fritz et al., 2002). Se ha descrito que la interrupción de estas *gap junction* es un proceso clave durante la ovulación (Granot, 1997), en donde NGF es un factor intrínseco clave (ver más abajo), ya que favorece la liberación del ovocito y la proliferación de las CGs remanentes que formarán posteriormente el cuerpo lúteo (Leung and Adashi, 2004).

Domínguez y colabs. (Dominguez et al., 1982), determinó por medio de una inyección subcutánea de atropina (de 100 a 700 mg/Kg de peso) que el bloqueo de los receptores muscarínicos podía inhibir la ovulación en ratas, pero tal efecto dependía de la fase del ciclo y del horario en que se realizaba el tratamiento. Se señala que el uso de dosis 7 veces mayores en proestro (700 mg/Kg de peso) que en diestro podría dar cuenta que al menos, en parte, tales resultados se deberían a efectos a nivel periférico. De forma interesante, tales efectos podían revertirse con un tratamiento con hCG (25 U.I.). Sin embargo, debido a que el fármaco atraviesa la barrera hematoencefálica, este estudio no permitió discriminar entre los efectos de atropina causados a nivel central y localmente dentro del ovario. Posteriormente, Cruz y colabs. (Cruz et al., 2006), utilizando un tratamiento farmacológico con atropina (100 a 700 mg/Kg de peso según fase del ciclo estral) encontró que además de inhibir la ovulación también lo hacía con la secreción de estradiol. Tal efecto también dependía de la fase del ciclo estral. Más recientemente, se determinó por medio del tratamiento farmacológico con una inyección intrabursal de 1 μ L de una solución de 4,5 μ M de pirenzepina que el bloqueo local del M1R del ovario izquierdo era necesario para inhibir la ovulación de los dos ovarios (Cruz et al., 2015). Sin embargo, estos efectos relacionados a la vía muscarínica no distinguen la acción del neurotransmisor a nivel local sobre las CGs/ células de la teca de los folículo, o bien a nivel central, vía la conexión ovario-sistema nervioso central mediado por el nervio vago (Gerendai et al., 2000).

Recientemente, en nuestro laboratorio se ha determinado que el aumento de ACh intraovárico crónico por medio de un tratamiento *in vivo* con un inhibidor de acetilcolinesterasa, huperzina A, administrado a una concentración de 10 μ M mediante una minibomba osmótica directamente al ovario durante 4 semanas, promueve el desarrollo folicular: aumenta el número de folículos secundarios pequeños y de los cuerpos lúteos; y disminuye el número quistes. Interesantemente, también se observó el incremento en el número de ovocitos implantados y en el número de crías nacidas vivas, que se interpretó como un aumento de la fertilidad (Urra et al., 2016). Además, se demostró que el tratamiento era capaz de recuperar la función ovárica una vez que la rata fue expuesta a estrés por frío crónico (Riquelme et al., 2021). A pesar de los efectos descritos de ACh en el ovario de distintas especies, no está claro qué factores podrían estar regulando su producción *in vivo*.

1.4. Factores que regulan el sistema colinérgico en ovario

Poco se sabe acerca de los factores que actuarían regulando la producción de ACh intraovárica y, en particular, la expresión de ChAT en el ovario de la rata. Por una parte, estudios en células GFSHR-17, una línea celular de granulosa de rata y que se ha descrito que no producen estrógenos, han demostrado que se produce un incremento en la producción de ACh frente a un estímulo de 0,5 I.U./mL de FSH durante 24 horas (Mayerhofer et al., 2006). Sin embargo, no se encuentran disponibles más trabajos que evalúen tales efectos de FSH sobre acetilcolina en otros modelos celulares.

Por otra parte, los trabajos en CGs humana y células luteales bovinas han demostrado que la incubación con NGF durante 24 horas produce un incremento en los niveles de la proteína ChAT (Al-Zi'abi et al., 2009; Meinel et al., 2015). Meinel y colabs., estudiaron los efectos de NGF y pro-NGF sobre cultivos de CGs humanas, y determinó que solo NGF (estimulación con 50 ng/mL en cultivos primarios de 2-3 días) promovió el incremento de los niveles de ChAT. Sin embargo, no se registró aumento en el número de células, algo que los autores del estudio lo relacionaron a la incapacidad del cultivo de proliferar (Meinel et al., 2015). En cultivos de células luteales bovinas, NGF también indujo un incremento en los niveles de la proteína ChAT, tal que la estimulación de los cultivos celulares primarios con 100 ng/mL de NFG durante 24 horas fue suficiente para tener este efecto (Al-Zi'abi et al., 2009). Tales resultados son interesantes ya que es sabido que NGF promueve el fenotipo colinérgico (incremento en el ARNm y proteína de ChAT) en cultivos neuronales primarios del prosencéfalo basal de ratas embrionarias (Pongrac, 1998).

En ovario de rata no se ha probado *in vitro* ni *ex vivo* si NGF tiene tales efectos en la expresión de ChAT. Por lo tanto, en base a esta evidencia, en este proyecto resulta fundamental estudiar si NGF induce la expresión de ChAT en el ovario de rata y produce un aumento de ACh. Además, se busca determinar si parte de los efectos de NGF conocidos sobre el ovario (en procesos tales como la ovulación y el desarrollo folicular) son mediados por un aumento local de acetilcolina y posterior activación de los receptores muscarínicos.

1.5. Efectos de NGF en el desarrollo folicular y su relación con el sistema colinérgico

NGF es una molécula sintetizada como una pro-neurotrofina y es procesada en el aparato de Golgi a su forma madura, β -NGF, con un peso molecular de 26 kDa y compuesta por dos monómeros idénticos de 13 kDa. Se ha visto el ARNm de NGF

principalmente en el ovario de rata en células de la teca y tejido intersticial (Dissen et al., 1996). Las acciones de NGF son mediadas vía unión a dos receptores: p75NTR y TrkA. El receptor p75NTR se une a NGF (así como otras neurotrofinas) con afinidad nanomolar, y en ovario de rata ha sido identificado por inmunohistoquímica abundantemente en células de la teca de folículos preantrales pequeños y antrales grandes (Dissen et al., 1991). Su unión a NGF tiene efectos pro-apoptóticos; sin embargo, en presencia de TrkA, se ha visto que favorece su unión al ligando y tiene efectos pro-sobrevivencia/diferenciación. Por otra parte, TrkA es un receptor tirosina quinasa, con una alta afinidad por NGF en presencia de p75NTR (concentración picomolar), y se encuentra presente tanto en CGs y células de la teca (Dissen et al., 2000), y se ha asociado con procesos ovulatorios debido a su aumento en fase preovulatoria. En el ovario de rata, ARNm de TrkA se ha identificado principalmente en células de la teca de folículos preovulatorios grandes y en tejido intersticial (Dissen et al., 1996).

El desarrollo folicular comienza con el reclutamiento de un folículo primordial desde el pool y por medio de un proceso estrictamente controlado estricto va a ocurrir el crecimiento hasta un folículo preovulatorio. Dentro de los distintos factores descritos que regulan todo este proceso se encuentra NGF, el que promovería la proliferación de las células mesenquimales (precuroras de las células de la teca), la diferenciación de los folículos primordiales a primarios, el crecimiento de los primarios y su diferenciación a secundarios, induciendo la expresión del receptor de FSH (Leung and Adashi, 2004). **En este proyecto es importante relacionar tal evidencia con los efectos descritos para la activación de los receptores muscarínicos.** Se ha descrito que NGF es importante para el desarrollo de la función ovárica normal en los primeros días de la rata (Lara et al., 1990c). La administración subcutánea de un anticuerpo anti-NGF durante los primeros 3 días de vida produjo un retardo en la apertura vaginal, una menor secreción de estradiol y de testosterona en presencia de hCG a los 29 días de edad. También se observó un aumento de los folículos preantrales y un menor tamaño de los folículos antrales. Interesantemente, en este trabajo se observó que en los ovarios de ratas tratadas con anti-NGF la actividad de ChAT disminuía en comparación a los controles no tratados.

La ovulación es un proceso dentro del desarrollo folicular que tiene una duración de unas horas y que se caracteriza por la liberación del ovocito desde un folículo maduro debido a la ruptura de la estructura folicular (Leung and Adashi, 2004). Se ha descrito que NGF junto a TrkA aumentan durante el proestro tardío (periodo de tiempo en el ciclo estral inmediatamente anterior a la ruptura folicular)(Dissen et al.,

1996), cuya señalización tendría efectos directos sobre la fosforilación de una proteína clave en la interacción célula-célula, la conexina 43 (Cushing et al., 2005). Se ha determinado que el uso local de un inhibidor de tirosina quinasa k252a (10 μ L de una solución a una concentración de 100 μ M) inhibe la ovulación y disminuye el número de cuerpos lúteos (Dissen et al., 1996). Respecto al sistema colinérgico, tal como se indicó más arriba, Dominguez (Dominguez et al., 1982) y Cruz (Cruz et al., 2015) han demostrado que el tratamiento con antagonistas de los mAChR inhibe la ovulación en rata. Además, se demostró que el tratamiento de cultivos de CGs con carbacol induce la fosforilación de la conexina 43 (Fritz et al., 2002). Por lo tanto, creemos relevante el estudio de la relación entre NGF-ACh para una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en los procesos de crecimiento y diferenciación de los folículos ováricos durante el desarrollo folicular.

Por otra parte, NGF tiene efectos tróficos sobre las neuronas simpáticas que inervan el ovario, promoviendo su desarrollo (Lara et al., 1990c). Sin embargo, cabe señalar que la sobreactivación simpática a largo plazo (tales como en el estrés crónico) induce un desarrollo folicular aberrante, que incluye la aparición de estructuras quísticas e hiperandrogenismo. Respecto a los efectos que tiene el tratamiento con NGF a largo plazo, se destacan dos trabajos relacionados al tratamiento intraovárico *in vivo*, en donde los efectos se pueden resumir en alteración de la ciclicidad estral y desarrollo folicular aberrante. En primer lugar, Dissen y colabs. implantaron células HiB5 que sobreproducen NGF en el ovario de ratas Sprague Dawley (Dissen et al., 2000). Las ratas permanecieron en estro posterior al tratamiento y se observó un aumento del tamaño de los folículos antrales atrésicos y normales, pero no hubo cambios en el número de cuerpos lúteos 60 días después del tratamiento. Posteriormente, en 2009, Dissen trabajó con un modelo de ratón transgénico que sobreexpresaba NGF bajo el promotor de la 17 α -hidroxilasa, para que fuera producido por células de la teca e intersticiales, las que se conocen como las principales productoras de la neurotrofina en el folículo (Dissen et al., 2009). Se determinó que estos ratones tenían un retardo en la pubertad y una fertilidad reducida, así como un aumento de los folículos antrales atrésicos. Interesantemente, se observó que el ratón transgénico presentaba un aumento en las neuronas tirosina hidroxilasa positivas que inervaban al ovario. Por otra parte, se ha observado que el tratamiento con estrés por frío (3 horas al día en un cámara a 4 °C) durante 4 semanas induce un aumento del contenido de noradrenalina y de NGF, en donde ocurre un aumento de las estructuras prequísticas, quísticas y una disminución en el número de folículos preantrales (Bernuci et al., 2013; Dorfman et al., 2003).

Evidencia reciente apoya un rol adicional de NGF, no como factor trófico, sino más bien como un factor que regula el desarrollo folicular, afectando la sobrevivencia o muerte de la población folicular (Manti et al., 2020). Sin embargo, no es sabido si las acciones primarias son mediadas por el NGF actuando sobre la actividad nerviosa o si promueve a la CGs para regular el crecimiento folicular o muerte durante el desarrollo. Interesantemente, NGF y TNF-alfa son parte de un mecanismo de retroalimentación similar al asociado a la respuesta inflamatoria, el que se ha vinculado con la función ovárica (Takei and Laskey, 2008).

El tratamiento crónico con NGF induce un desarrollo folicular aberrante y alteración de la función ovárica normal (ciclicidad, esteroidogénesis) a través de la activación de la vía simpática. **Sin embargo, no hay información acerca de lo que estaría pasando con el sistema colinérgico intraovárico en este contexto.** De esta forma, en este proyecto se considera relevante estudiar qué pasaría con el sistema colinérgico bajo una estimulación de 4 semanas con NGF, y si parte de los efectos conocidos de NGF sobre el desarrollo folicular (proceso a largo plazo) podrían ser mediados por estimulación de la producción de acetilcolina.

1.6. Estrés crónico y PCO

Tanto los sistemas colinérgicos como los noradrenérgicos regulan las funciones ováricas, probablemente trabajando juntas o participando en una forma balanceada para regular la función ovárica, similar a la regulación autónoma de muchos órganos internos (Riquelme et al., 2019). Su función estaría relacionada en la mantención de las condiciones homeostáticas del órgano, especialmente cuando la otra parte del eje neuroendocrino (i.e. el control dependiente de gonadotropinas del ovario) está siendo modificada. En este sentido, el síndrome del ovario poliquístico (*PCOS*, por sus siglas en inglés), la patología ovárica que es la causa más frecuente de infertilidad en la mujer, se caracteriza por profundos cambios en el desarrollo folicular, resultando en una secreción ovárica esteroïdal alterada. En esta condición, tanto la disfunción neuroendocrina como nerviosa han sido observadas dentro de los muchos cambios relacionados a los eventos metabólicos y cardiovasculares asociados con este síndrome (Lansdown and Rees, 2012). Es por esto que son importantes los estudios en ésta área usando modelos animales del fenotipo PCO. En este sentido, estudios recientes han encontrado que el estrés simpático, tal como la exposición crónica al frío (4°C por 3 hrs cada día por 4 semanas), no solamente activa las fibras nerviosas simpáticas que inervan el ovario sino que también el sistema colinérgico intraovárico (Riquelme et al., 2019). Sin embargo, no se conoce cuál es la señal primaria que

activa ambos sistemas. NGF fue el primer factor neurotrófico encontrado que regula las neuronas noradrenérgicas que inervan el ovario (Ojeda and Lara, 1989). La evidencia sugiere que NGF, actuando en las fibras simpáticas, aumenta la noradrenalina en el ovario por un efecto directo de NGF o inducido por estrés (Dissen et al., 2000; Dorfman et al., 2003) y puede participar en el desarrollo del fenotipo PCO en rata. Además, NGF es una de los factores más importantes en la regulación de las neuronas colinérgicas en el sistema nervioso central, pero hay información limitada de su acción colinérgica en el ovario de rata. Probablemente ésta neurotrofina actúa aumentando la concentración de ACh cuya participación en la fisiología ovárica acaba de ser descrita (Riquelme et al., 2021; Urra et al., 2016); y de la que mucho menos se sabe en condición patológica, tal como el fenotipo PCO en rata.

1.7. Objetivo de este trabajo

Estudios previos de las acciones de NGF y noradrenalina en el ovario han mostrado que NGF participaría en el desarrollo folicular no solo relacionado a efectos directos o vía control de la actividad nerviosa, sino que también se ha involucrado en el control del sistema colinérgico de las células foliculares ováricas. Así, el principal objetivo de este estudio fue determinar si NGF es uno de los factores neurotróficos involucrados en la activación del sistema colinérgico del ovario *in vivo*. En este trabajo, presentamos información de un mecanismo neurotrófico común actuando en las neuronas noradrenérgicas y en las células productoras de ACh para balancear el tono autonómico y mantener la homeostasis del órgano.

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

El aumento de acetilcolina intraovárica está dirigido por el factor de crecimiento neuronal (NGF), producido por el ovario, y promueve el desarrollo folicular.

2.2. Objetivo General

Demostrar que el incremento de NGF in vivo aumenta los niveles de acetilcolina en el ovario de la rata, promoviendo el desarrollo folicular a través de la activación de este sistema colinérgico.

2.3 Objetivos específicos

- a) *Demostrar que NGF produce un aumento de los niveles de ChAT y acetilcolina in vitro en ovario de rata: Ovarios de ratas prepúberes fueron incubados con NGF y por RT-PCR semicuantitativo se determinaron los cambios para el ARNm de chat y se determinaron los cambios en los niveles de ACh.*

- b) *Demostrar que el aumento local de NGF produce un aumento de los niveles de ChAT y acetilcolina intraováricos in vivo en rata y promueve la ovulación: Los animales fueron expuestos a un tratamiento agudo y local en el ovario con NGF y se determinó los cambios en los niveles de ARNm de ChAT y en los niveles de acetilcolina.*

- c) *Demostrar que un tratamiento crónico de NGF intraovárico durante 4 semanas produce un aumento de acetilcolina intraovárico in vivo en ratas y promueve el desarrollo folicular: Los animales recibieron un tratamiento crónico y local en el ovario con NGF durante 4 semanas y se determinaron los cambios en los niveles de acetilcolina y proteína ACHE. Los cambios en el desarrollo folicular se determinaron a través de estudios de morfometría de cortes de ovario teñidos con hematoxilina/eosina.*

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. *Animales y diseño experimental*

Estudiamos los efectos de NGF en el sistema colinérgico del ovario de la rata. En primer lugar, realizamos la implementación del RT-qPCR para la determinación del ARNm de ChAT (Soret et al., 2010). Luego realizamos una caracterización de ChAT y otros marcadores colinérgicos en la pubertad de la rata. Los experimentos *in vivo* los dividimos en dos: 1) estudios *in vivo* para estimular endógenamente la producción de NGF intraovárico y promover la producción de ACh mediado por las CGs ováricas (Fritz et al., 2001); y 2) una exposición *in vivo* crónica por medio de la administración intrabursal de NGF al ovario (Dissen et al., 2000; Lara et al., 2000). Una vez determinados los efectos *in vivo*, estudiamos los efectos de NGF *in vitro* para verificar un efecto local en los marcadores colinérgicos. Después de que definimos su rol en la actividad de estos marcadores bioquímicos, analizamos el desarrollo folicular y función esteroideogénica en las ratas tratadas con NGF. Finalmente, para diferenciar los efectos colinérgicos, también analizamos el efecto del agonista muscarínico carbacol administrado crónicamente en el ovario sobre los marcadores colinérgicos.

En este estudio se utilizaron 72 ratas hembras *Sprague Dawley*: seis animales neonatos (edad: 7 días), 15 animales prepuberales (21 días), 12 animales peripuberales y 39 adultas (60 días) (tabla 1). Además, se usaron ovarios de ratas tratadas con valerato de estradiol (EV) (dosis única intramuscular (i.m.), 10 mg/Kg). Ya que la regulación bioética sugiere usar tejidos de otros experimentos previamente publicados, para éste último estudio usamos ovarios de un trabajo previo (Del Campo et al., 2020), que fue almacenado a -80 °C para la determinación posterior de ACh. Todos los animales fueron alojados en una habitación de mantenimiento a 20 °C con ciclos luz-oscuridad (12:12 hrs). Los animales fueron provistos de comida y agua *ad libitum*. El ciclo estral de las ratas adultas fue monitoreada vía frotis vaginal diariamente observado en un microscopio de luz, como se ha descrito previamente (Riquelme et al., 2019; Squicciarini et al., 2018). El número de ciclos fue estimado como el paso regular del proestro (P) a estro (E), seguido por diestro (D). Ratas control (sham) tenían una actividad regular estral de 4 días (Hubscher et al., 2005; Paccola et al., 2013). Al final de los experimentos, las ratas fueron eutanasiadas por decapitación, y los ovarios y plasma fueron recolectados y almacenados a -80°C para su posterior análisis. La decapitación fue realizada por personal especializado de acuerdo a la guía de AVMA para la Eutanasia de Animales (Edición 2020) (AVMA, 2020). El estudio fue aprobado por el Comité Bioética de la Facultad de Ciencias

Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile (Número de protocolo: CBE2017-14 para AB y CBE2017-05 para HL) y cumplió con las directrices nacionales (Guía CONICYT para el cuidado y uso de los animales de laboratorio).

Tabla 1: Grupos experimentales usados para el estudio de los efectos de NGF en el sistema colinérgico intraovárico por medio de la incubación *in vitro* y la administración *in vivo* de NGF o carbachol por el uso de una minibomba osmótica.

Condición	N	Edad	Tratamiento	Ovario	Análisis
Control	19	Adulta	Control	Ovario Ovario	ARNm Western blot/IHQ
Control	1	Prepuberal	Control	Medio ovario Ovario	ARNm Western Blot
Control	12	Peripuberal	Control	Medio ovario Medio ovario Medio ovario Medio ovario	ARNm ACh Western Blot IHQ
Sham	4	Prepuberal	7 d	Medio ovario Medio ovario Ovario	ARNm ACh Western blot
SONX	4	Prepuberal	7 d	Medio ovario Medio ovario Ovario	ARNm ACh Western blot
Sham	3	Neonata	84 d	Medio ovario Medio ovario Ovario	ACh NA Western blot
+GD	3	Neonata	84 d	Medio ovario Medio ovario Ovario	ACh NA Western blot
Sham	5	Adulta	28 d	Medio ovario Medio ovario	Bioquímico Morfología
+NGF	5	Adulta	28 d	Medio ovario Medio ovario	Bioquímico Morfología
Sham	5	Adulta	28 d	Medio ovario	Morfología
+ Carbachol	5	Adulta	28 d	Medio ovario	Morfología
Control	6	Prepuberal (un ovario)	Control medium	Medio ovario Medio ovario	Bioquímico ARNm
		Prepuberal (un ovario)	NGF(100 ng/mL)	Medio ovario Medio ovario	Bioquímico ARNm

3.2. Estudios de denervación e incremento endógeno de NGF

Para el experimento de denervación quirúrgica del nervio ovárico superior (SONX) o farmacológica con guanetidina (GD), 8 ratas prepúberes (24 días de edad) fueron asignadas aleatoriamente al grupo sham (control) (n=4) o grupo SONX (n=4); y 6 ratas neonatas (7 días de edad) asignadas aleatoriamente al grupo sham (n=3) y grupo GD (n=3), respectivamente (Tabla 1). Se realizó denervación quirúrgica del

nervio ovárico superior (SONX), el que inerva los componentes endocrinos del ovario, para inducir un aumento endógeno de NGF de acuerdo a lo descrito anteriormente (Barria et al., 1993; Lara et al., 1990a). Brevemente, los animales fueron anestesiados con una dosis intramuscular de una solución con ketamina 60 mg/Kg y xilacina 10 mg/kg bajo condiciones asépticas; los ovarios fueron expuestos a través de una incisión dorsal, y el SON fue seccionado con un microcauterizador (Barria et al., 1993). Después de 6 días, las ratas fueron eutanasiadas y los ovarios fueron recolectados para análisis.

Por otra parte, al día 7 post natal, las 3 ratas del grupo GD fueron tratadas con monosulfato de guanetidina (Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, EE.UU.), tal como se describió antes (Lara et al., 1990b). Brevemente, GD fue administrado intraperitonealmente (i.p.) a una dosis de 50 mg/Kg, 5 días a la semana, por 3 semanas. El fármaco fue disuelto diariamente en suero fisiológico, ajustado a pH 7,4 y la solución fue esterilizada pasándola a través de un filtro de 0,22 μ m. Las 3 ratas control recibieron un volumen equivalente de la solución salina. Ochenta y cuatro días después del término del tratamiento, los animales fueron eutanasiados en estro y los ovarios fueron recolectados para su análisis posterior.

3.3. Estudios de administración in vivo de NGF y carbacol

Veinte ratas hembras adultas fueron aleatoriamente asignadas ya sea al grupo sham (n = 5) o grupo NGF (n = 5) para los estudios de NGF; y grupo sham (n = 5) o grupo carbacol (n = 5) para los estudios de carbacol, respectivamente (Tabla 1). Los animales fueron anestesiados con una dosis intramuscular de una solución con ketamina 60 mg/Kg y xilacina 10 mg/kg bajo condiciones asépticas. Para eliminar la posible contribución del ovario contralateral a la esteroidogénesis, todos los animales sham, tratados con NGF- y carbacol fueron sujetos a una ovariectomía unilateral (ULO) al momento de la implantación de la minibomba (Squicciarini et al., 2018), realizado tal como se describió previamente (Lara et al., 2000). Brevemente, una incisión media lumbar transversal, 1,5 cm de largo, fue hecha del área del flanco de un lado del animal para obtener acceso a la bursa ovárica. La minibomba osmótica ALZET ([0,25 μ L/h], modelo 2004, Alza Corp. Palo Alto, CA, EE.UU) fue conectado a la bursa subyacente al ovario izquierdo con tubo SILASTIC 0,64 mm ID x 1,19 mm OD CAT 508-003 (Dow Corning Corp, Midland, MI, EE.UU) por 28 días. El tratamiento fue realizado como sigue:

- a) Los animales del grupo NGF fueron implantados con minibombas osmóticas para la entrega intraovárica de NGF a una concentración final de 100 ng/mL en solución salina (número catálogo N-100, Alomone, Labs, Jerusalén, Israel).
- b) Los animales del grupo carbacol fueron implantados con minibombas osmóticas para la entrega intraovárica de carbacol a una concentración de 100 μ M en solución salina (número catálogo 212385-M; Calbiochem, Sigma Chemicals, San Luis, MO, USA). Carbacol es un agonista colinérgico muscarínico no específico que no es degradado por ACHE.
- c) Los animales del grupo sham fueron sujetos a cirugía e implantados con la cánula llena con solución salina (el solvente de ambos fármacos) pero no con la minibomba osmótica.

Después de 28 días, las ratas fueron eutanasiadas en estro y el ovario y la sangre fueron recolectados para análisis. La posición de la bomba y la cánula fue inspeccionada para verificar que estaban en posición después del periodo de tratamiento. Los ovarios fueron partidos a la mitad, y una mitad fue fijada en solución de Bouin para análisis morfométrico. La otra mitad fue partida a la mitad, y cada mitad fue almacenada a -80 °C para la determinación de ACh o análisis de western blot posterior.

3.4. Estudios *in vitro* de NGF

Para estudiar los efectos de NGF en la producción de ACh en los ovarios, usamos seis ratas prepúberes (Tabla 1), debido a que a su edad no ha habido ovulación y no hay cuerpos lúteos. De esta forma, pudimos estudiar el efecto de NGF principalmente en las CGs, principales productoras de ACh en el ovario (Fritz et al., 1999; Fritz et al., 2001). Las ratas fueron eutanasiadas, y ambos ovarios fueron removidos a través de la incisión anterior en la línea media del abdomen. Los ovarios fueron partidos (2 ovarios = 4 mitades por animal) y cada mitad fue incubada por 3 hrs a 37 °C en 1,0 mL de buffer albúmina-bicarbonato de Krebs (NaCl, 118,6 mM; KCl, 4,7 mM; KH₂PO₄, 1,2 mM; ácido ascórbico, 100 μ g/mL; NaHCO₃, 0,15 M; CaCl₂, 25 mM; albumin, 0,1 mg/mL; glucosa, 11,2 μ g/mL), bajo 95 % de oxígeno y 5 % CO₂. Para cada condición, los animales fueron aleatoriamente divididos en grupos de seis. Una mitad fue incubada solo en buffer Krebs (grupo control), y la otra mitad fueron incubados con NGF a 100 ng/mL (número catálogo N-100, Alomone Labs, Jerusalén, Israel). La concentración de NGF utilizada ha demostrado ser suficiente para aumentar los niveles de la proteína ChAT en CGs humana y los niveles de ACh en células luteales bovinas (Al-Zi'abi et al., 2009; Meinel et al., 2015). Después de la incubación,

los ovarios fueron almacenados a -80 °C para la extracción de ARNm o determinación posterior de ACh.

3.5. Reacción de la polimerasa en cadena en tiempo real (RT-qPCR)

El ARN total fue extraído desde las mitades de ovario incubadas *in vitro*, tal como se describió previamente (Chomczynski and Sacchi, 1987). Los partidores usados fueron listados en la Tabla 2. Una búsqueda BLAST fue realizada para determinar la especificidad de las secuencias. El mix de PCR contenía 10 uL del Master Mix Brilliant II SYBR Green QPCR (Agilent Technologies, INC., California, USA), 0,01 µM de cada primer GAPDH, 0,1 µM de cada primer de ChAT o 0,1 µM de cada primer del VACHT, 2 ug de ADNc, y agua estéril para un volumen final de 20 uL. Los PCR fueron realizados usando un termociclador IQ5 (Bio-Rad) bajo las siguientes condiciones: 95 °C para 20 s, 60 °C para 20 s, 72 °C para 20 s, y una extensión final de 72°C para 10 minutos. Todas las muestras para análisis de RT-qPCR semicuantitativo fueron corridas en triplicado (como control negativo se consideró reemplazar las muestras por agua estéril), y los valores promedio fueron usados para determinar los niveles de ARNm. Las cuantificaciones relativas de ARNm de ChAT y

Gen	Secuencias	Número de acceso	(Ref.)
ChAT	<i>forward</i> 5'- CTGGATTTTCATTGTTTATAAGTTTGACAAC-3'	XM_00106152	(Soret et al., 2010)
	<i>reverse</i> 5'- CTGGAGGGCCACCTGGAT-3		
VACHT	<i>forward</i> 5'- GCCACATCGTTCACTCTCTTG-3'	X80395	(Lips et al., 2007)
	<i>reverse</i> 5'- CGGTTTCATCAAGCAACACATC-3'		
GAPDH	<i>forward</i> 5'- GATGCCCCCATGTTTGTGAT -3'	NM_017008.4	(Chen et al., 2014)
	<i>reverse</i> 5'- GGTCATGAGCCCTCCACAAT-3'		

VACHT fueron realizadas usando ARNm de GAPDH como control de carga.

Tabla 2: Partidores usados para la amplificación de PCR

3.6. Análisis Western Blot

Para el análisis western blot, los ovarios fueron homogenizados en 1 volumen de buffer RIPA (1% NP40; 0,5 % de deoxicolato sódico y 0,1% SDS en PBS; solo antes del uso, se agregó 10 uL de la siguiente mezcla: 10 mg/mL de solución stock de PMSF, aprotinina y ortovanadato sódico) en presencia del cocktail de inhibidores de proteasas libre de EDTA (Roche, Basilea, Suiza). Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford, y 50 ug (o de acuerdo a lo señalado en el texto) fueron separados en un gel al 10 % de poliacrilamida (o según se señale en el texto). Las

proteínas fueron transferidas a la nitrocelulosa, bloqueado con 5 % de leche por 1 hora (o de acuerdo a lo señalado en el texto), e incubado con un anticuerpo que reconoce todas las isoformas de ACHE (n° catálogo A-11; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EE.UU) a una dilución de 1:3.000 durante toda la noche; NGF (n° catálogo AN-240, Alomone Labs, Jerusalén, Israel) a una dilución 1:250 durante toda la noche; o la tirosina hidroxilasa (n° catálogo MAB5280; Merck Millipore, Burlington, MA, EE.UU) a una dilución de 1:1000 , durante toda la noche. Como un control interno, usamos GAPDH (G9545; Sigma Chemicals, San Luis, MO, EE.UU) a una dilución de 1:40.000 por 1 hora. Los anticuerpos secundarios usados fueron IgG Fc (HR) (n° catálogo 31430, Waltham, Massachusetts, EE.UU) a una dilución de 1:10.000 por 1 hora. Los complejos de anticuerpos fueron detectados por quimioluminiscencia usando el kit de detección de luminiscencia potenciada EZ-ECL (Biological Industries, KBH, Israel). La quimioluminiscencia fue capturada usando el sistema Syngene G-BOX (Syngene Headquarters, MD, EE.UU.).

3.7. *Análisis por Inmunohistoquímica*

Para el análisis por inmunohistoquímica (IHQ), los ovarios fueron fijados en solución Bouin, embebidos en parafina y cortados a 6 μ m cada uno. El tejido fue permeabilizado con tritón x100 al 0,1 %, la recuperación antigénica fue hecha por un calentamiento en microondas a 800 W por 10 minutos en buffer 10 mM Tris/ 1mM EDTA/ 0,05% Tween 20, pH 9,0, y lavado 3 veces con PBS. Las muestras fueron incubadas por 30 minutos con solución al 3% de peróxido de oxígeno y 10 % de metanol para desactivar las peroxidasas endógenas. Se utilizó solamente el anticuerpo anti-ChAT n° catálogo AB144 (Millipore Sigma, Burlington, Massachusetts, EE.UU.). La incubación fue hecha durante toda la noche (16 hrs) con dilución 1/250 o 1/500 de anticuerpo anti-ChAT, según se indique, en presencia de suero de burro al 5%. En el segundo día el tejido fue lavado con PBS e incubado con anticuerpo secundario 1/200 por 1 hr. Después de incubar las muestras con estreptavidina-HRP, se utilizó el kit ImmPACT VIP Peroxidase Substrate (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.) para detectar la señal cromogénica siguiendo las instrucciones del fabricante. Las imágenes fueron obtenidas usando un microscopio de luz Olympus (modelo Olympus CX31, Tokio, Japón) con el software Micrometrics SE Premium 4 (ACCU-SCOPE, Inc, Commarck, NY, EE.UU.)

3.8. Cuantificación de los niveles intraováricos de ACh y actividad de ACHE

El ovario fue homogenizado en 10 volúmenes de PBS en hielo. Los niveles de ACh y la actividad de ACHE fueron determinados en el homogenizado usando el kit de ensayo ACh/ACHE Amplex (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) de acuerdo a las instrucciones recomendadas por el proveedor (Riquelme et al., 2019; Urra et al., 2016). Los resultados presentan la cantidad total de ACh en μmol por ovario y la actividad de ACHE en U por ovario (donde un U está definido como la cantidad de la enzima que hidroliza 1,0 μmol de ACh a colina y acetato por minuto a pH 8 a 37 °C, como lo indica el fabricante). El valor mínimo detectable para ACHE fue 0,002 U/mL y por ACh fue 0,3 μM (intervalo: 0,3 μM a 100 μM).

3.9. Cuantificación de los niveles NGF por ELISA

La determinación de los niveles de NGF también se realizó por ELISA de acuerdo a las indicaciones del fabricante (número de catálogo SEA106Hu, Cloud-Clone Corp., Houston, EE.UU.). Brevemente, 50 mg de muestra fue homogenizado con 1 mL de buffer de lisis, se centrifugó a 10.000 g y del sobrenadante se tomaron 100 μL para incubar por 1 hr en las placas con anticuerpos a 37 °C en estufa. Se descartó el sobrenadante y se incubó la placa con 100 μL del reactivo A durante 1 hr a 37 °C. Luego, la placa se lavó 3 veces con 350 μL de buffer de lavado y se incubó con 100 μL de reactivo B durante 30 minutos a 37 °C. Se lavó nuevamente 5 veces y se agregaron 90 μL de solución sustrato TMB y se incubó por 15 minutos a 37 °C. Finalmente se agregaron 50 μL de solución de detención de la reacción y se leyó a 450 nm en lector de placas. El intervalo de medición del kit es de 15,6 a 1000 pg/mL, con una sensibilidad de 5,4 pg/mL.

3.10. Análisis morfométrico

Las mitades de ovarios fueron fijados en solución de Bouin, embebidos en parafina, cortados en secciones de 6 μm y teñidos con hematoxilina y eosina. Los análisis morfométricos de todos los ovarios fueron realizados de acuerdo a lo descrito previamente (Hirshfield and Midgley, 1978) con las modificaciones descritas por Lara y colabs. (Lara et al, 2000), usando $n = 5$ para cada grupo sham, $n = 5$ para el grupo NGF, y $n = 5$ para el grupo carbacol. Usamos la siguiente clasificación: los folículos primarios tienen una capa de CGs cuboidales, y los folículos secundarios no tenían cavidad antral pero dos o tres capas de CGs. Los folículos antrales son los que tienen más de tres capas de CGs sanas, el antro y un núcleo claramente visible en el ovocito. Los folículos atrésicos tenían más del 5 % de las células con núcleo picnótico en la

sección central más larga y exhibieron encogimiento y rompimiento ocasional de la vesícula germinal. Los folículos prequísticos eran folículos largos con o sin ovocito, conteniendo cuatro o cinco capas de CGs pequeñas y empaquetadas densamente rodeadas de un antro largo con un compartimento de teca aparentemente normal. Folículos quísticos no tienen ovocito y muestra una cavidad antral larga, una capa de teca bien definida, y un compartimento de GC delgado (habitualmente monocapa) conteniendo aparentemente células sanas. Todas las estructuras foliculares anormales fueron agrupadas como estructuras quísticas.

3.11. Niveles plasmáticos de hormonas esteroidales.

Los niveles plasmáticos de las hormonas esteroidales progesterona (P4), androstenediona ($\Delta 4$), testosterona y estradiol (E2) fueron medidos. Los niveles séricos de P4, $\Delta 4$, testosterona y E2 fueron determinados por inmunoensayo enzimático (IEE), siguiendo las instrucciones del fabricante (Alpco Diagnostic, Windham, NH, EE.UU.). Variaciones intra e interensayo fueron menos que el 5% para progesterona, menos que 10 % para $\Delta 4$, menos que 6% para testosterona, y menos que 5% para E2, y los valores mínimos detectables fueron 0,1 ng/mL, 0.04 ng/mL, 0,02 ng/mL y 10 pg/mL, respectivamente.

3.12. Análisis estadístico

La información fue expresada como promedio \pm error estándar medio (EEM). Los análisis fueron realizados usando Prism GraphPad 6 (GraphPad Software, San Diego, California, EE.UU). Test de t-Student y de Mann-Whitney fueron usando para examinar las diferencias estadísticas entre los dos grupos, como se describe más abajo. Para analizar las diferencias entre proporciones, usamos el test chi-cuadrado. Para determinar la distribución normal de nuestra información, usamos el test de normalidad Shapiro-Wilk.

El número de animales para todos los experimentos fueron calculados como el número mínimo de animales de acuerdo a la variabilidad de los procedimientos experimentales y la variación intrínseca entre ellos. El mínimo número de animales fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación (Zar, 1984):

$$n = \frac{(Za + Zb)^2 \times S^2}{d}$$

Donde n es el número de animales para cada condición, S = desviación estándar, d = diferencia necesaria para obtener la diferencia estadística, Za= la probabilidad de un error tipo I (significancia), y Zb = probabilidad de un error tipo II

(poder). En los experimentos para determinar ACh, y la actividad de ACHE y los niveles plasmáticos de hormonas, fueron propuesto $\alpha = 0,05$, la probabilidad de hallar una diferencia estadísticamente significativa fue $0,05$; $b = 0,3$, la probabilidad de tener una diferencia entre las poblaciones; la variación intrapoblacional fue de $0,2$; y d , la diferencia más pequeña en la población, fue de $0,11$. Así, nosotros obtuvimos $n = 4,5$. Por lo tanto, para obtener una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0,05$, necesitamos usar al menos cuatro animales para el estudio.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización de ChAT en ovario de rata

4.1.1. Implementación de determinación de ARNm de ChAT por RT-PCR semicuantitativo

Se ha descrito la presencia de la proteína ChAT en folículos antrales del ovario de la rata. Sin embargo, hasta ahora no se había descrito la presencia de ARNm de ChAT en ovario de rata (Fritz et al., 2001). Por lo tanto, en primer lugar se implementó la determinación por medio de RT-qPCR semicuantitativo a partir de protocolos previamente publicados (Soret et al., 2010). En la Fig.1 se puede observar que el tamaño del amplicon obtenido fue de aprox. 100 pb, tal como se esperaba (96 pb)(Fig.1A). La temperatura de fusión (T_m , del inglés *melting temperature*), fue de 76,5°C, acorde a lo esperado para el tamaño del fragmento y al contenido de CG (Fig. 1B).

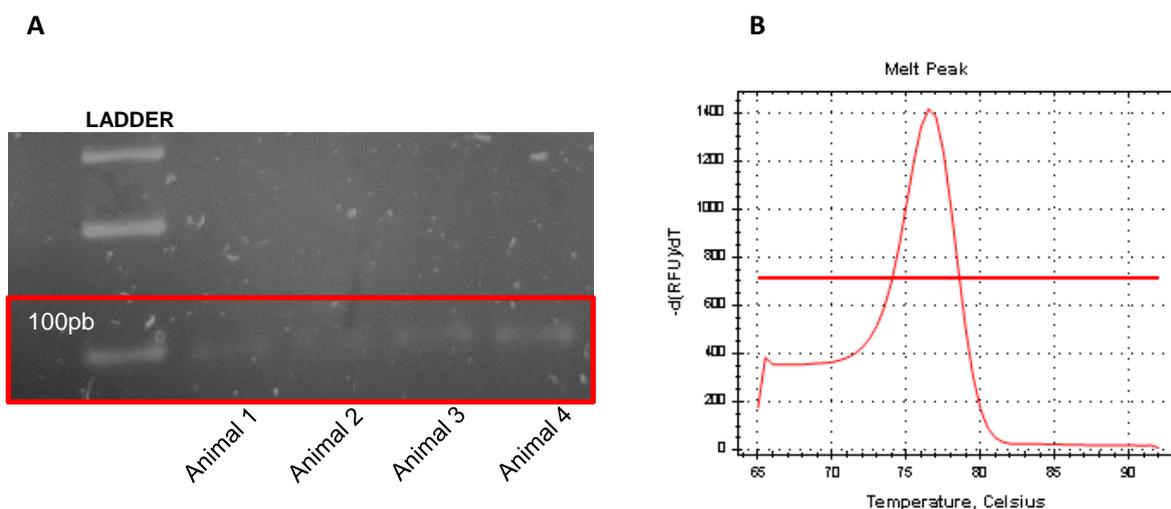


Figura 1: Amplificación ARNm de ChAT. A. Gel agarosa con banda de 100 pb. B. Curva de temperatura de fusión.

Para determinar la distribución del ARNm de ChAT, se separaron las CGs del resto del ovario (células de la teca y tejido intersticial). Tal como se esperaba, se encontró que está era significativamente más abundante en la fracción enriquecida en CGs (Fig.2).

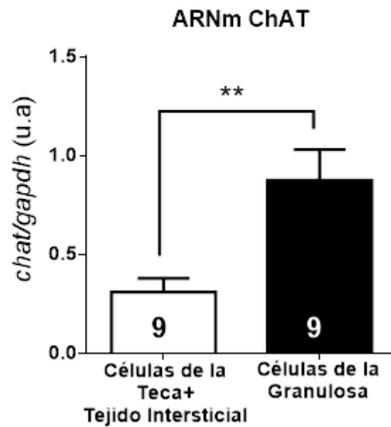


Figura 2: Niveles de ChAT en células de la teca e intersticio celular; y en células de la granulosa (CGs). Se encontraron mayores niveles en CGs. Todos los valores corresponden al promedio \pm EEM ($n=9$ de cada grupo). Análisis estadístico de t-student no pareado, $**p < 0,01$.

4.1.2. Implementación de western blot y técnica inmunohistoquímica para proteína ChAT

Se utilizaron dos anticuerpos anti-ChAT de distintas marcas (Santa Cruz [n° catálogo sc-55557] y Millipore Sigma [n° catálogo AB144])(Fig. 3-4), pero no fue posible determinar la proteína ChAT por medio de western blot (WB) en muestras de ovario de ratas prepuber ni adultas bajo ninguna de las condiciones probadas. Sin embargo, uno de los anticuerpos utilizados (n° catálogo AB144, Millipore Sigma) sí permitió detectar ChAT en muestra enriquecidas de hipotálamo (tejido compuesto de somas de neuronas colinérgicas (Mekker et al., 1988), en una dilución 1/500 (Fig.4A). La especificidad de la señal se determinó por medio del uso de 5 ug del péptido de bloqueo para el anticuerpo anti-ChAT del proveedor (n° catálogo AG220, Millipore Sigma) (Fig.4B).

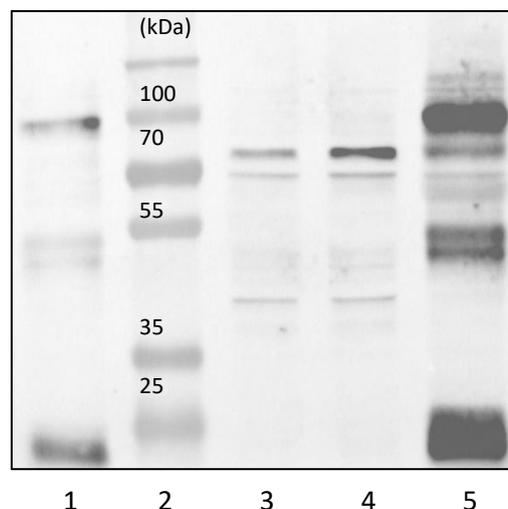


Figura 3: Determinación de ChAT por western blot con anticuerpo anti-ChAT Santa Cruz (n° cat. sc-55557). Gel al 10 % poliacrilamida; dilución: 1/250; bloqueo con leche entera al 5% durante 90 minutos; tiempo de revelado: 105 segundos. Carril 1: 50 ug Ovario (rata adulta estresada); Carril 2: Ladder (n° cat

26619, Thermofisher, Waltham, Massachusetts; EE.UU.); Carriles 3 y 4: 20 y 50 ug de homogenizado enriquecido en cerebro (rata adulta); Carril 5: 50 ug ovario (rata adulta).

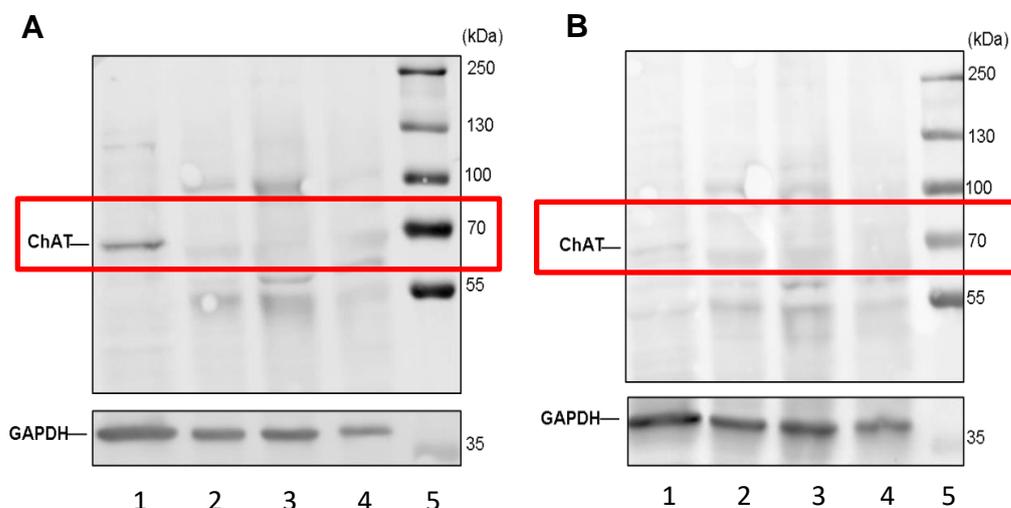


Figura 4: Determinación de ChAT por western blot en muestra de rata con anticuerpo anti-ChAT de Sigma (n°cat. AB144) y bloqueo con péptido (n° cat. AG220). Gel poliacrilamida al 10 %. A. Dilución: 1/500, bloqueo con suero fetal bovino al 5%, tiempo bloqueo 90 minutos. B. Anticuerpo bloqueado con péptido de bloqueo, 5 ug ChAT recombinante. Carril 1: 100 ug homogenizado enriquecido en hipotálamo (100 ug); Carriles 2 y 3: 50 ug ovario (rata adulta); Carril 3: 50 ug ovario (rata adulta); Carril 4: Ovario (rata prepúber); Carril 5: Ladder (n°cat 26619, Thermofisher, Waltham, Massachusetts; EE.UU.).

Debido a las limitantes técnicas para implementar WB, se evaluó la factibilidad de la detección de la proteína en ovario por medio de IHQ. Interesantemente, se encontró inmunoreactividad positiva a una dilución 1/100 del anticuerpo, asociada al ovocito de folículos preantrales y antrales, en tejido intersticial y, al parecer y en menor medida, a CGs (Fig.5). Además, se determinó la especificidad de la inmunoreactividad positiva para ChAT en los ovocitos, pre-incubando el anticuerpo anti-ChAT con 15 ug del péptido de bloqueo (Fig.5). Los resultados discreparon con lo publicado previamente (Meinel et al., 2015), sin embargo, dentro de las diferencias entre ambos estudios, se encontró que las ratas se encontraban en un periodo de edad distinta (ratas prepúberes vs adultas). En este sentido, se ha descrito previamente los cambios funcionales ováricos de otro neurotransmisor, noradrenalina, y su receptor β 2-noradrenérgico, cuyos niveles varían durante el ciclo así como su capacidad esteroideogénica (Ricu et al., 2008). Por lo tanto, ya que parte de este trabajo es comprender los factores que participan en la promoción del desarrollo folicular, se consideró relevante explorar los cambios en los niveles de acetilcolina y ChAT en la pubertad. Estos cambios podrían explicar las diferencias entre los hallazgos de este trabajo con los resultados previamente publicados.

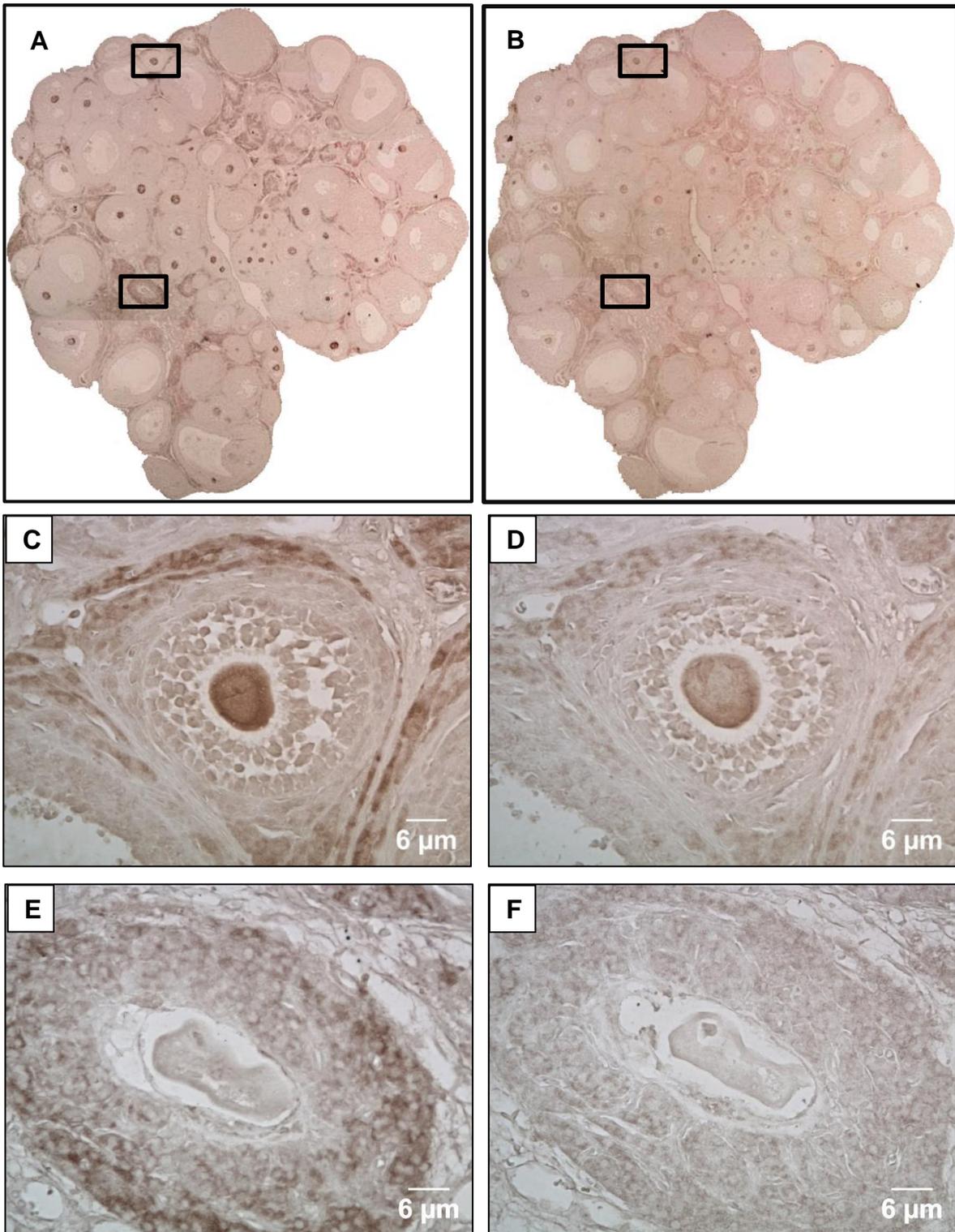


Figura 5: IHQ para ChAT con anticuerpo Sigma (n°cat. AB144). A.C.E. Dilución 1/100. B.D.F. Incubación del anticuerpo dil. 1/100 con péptido de bloqueo, 15 ug ChAT recombinante. Se determinó inmunoreactividad positiva en ovocito e intersticio (C) y células de la granulosa de folículos atrésicos (E).

4.1.3. Estudio del sistema colinérgico en la rata prepúber y púber

Encontramos que durante la pubertad, en estro y diestro hay una disminución en la concentración de acetilcolina intraovárica en comparación a ovarios de ratas de 26 días (Fig.6). Además, se observó un aumento significativo del ARNm de ChAT y M1R (Fig.6 A, C y E) en ratas en diestro en comparación a las ratas prepúberes. No se observaron cambios en los ARNm de ACHE, M3R y M5R (Fig.6 D, F y G), ni en el contenido de acetilcolina (Fig.6B). Por medio de western blot, tampoco se encontraron cambios en los niveles de ACHE entre los distintos grupos de animales (resultado no mostrado).

Finalmente, la inmunoreactividad para ChAT en cada grupo (Fig.7) pareciera ser mayor en ovocito que en cualquier otra estructura. Además, coincide cualitativamente el tejido marcado con los niveles de acetilcolina (Fig.6A). Se observó la presencia de inmunoreactividad positiva inclusive en folículos preantrales, principalmente en folículos primarios en distintas fases del ciclo (Fig.7).

En resumen, los resultados indican que el contenido de acetilcolina no cambia durante la pubertad. Al parecer, la formación de cuerpos lúteos, los que no aportan a la producción del neurotransmisor, produce la disminución en la concentración de acetilcolina. Sin embargo, todos estos resultados requieren de mayor estudio, ya que solo fueron exploratorios (n=3). La descripción completa del sistema se aleja del objetivo principal de la tesis, por lo que decidimos continuar con los grupos experimentales.

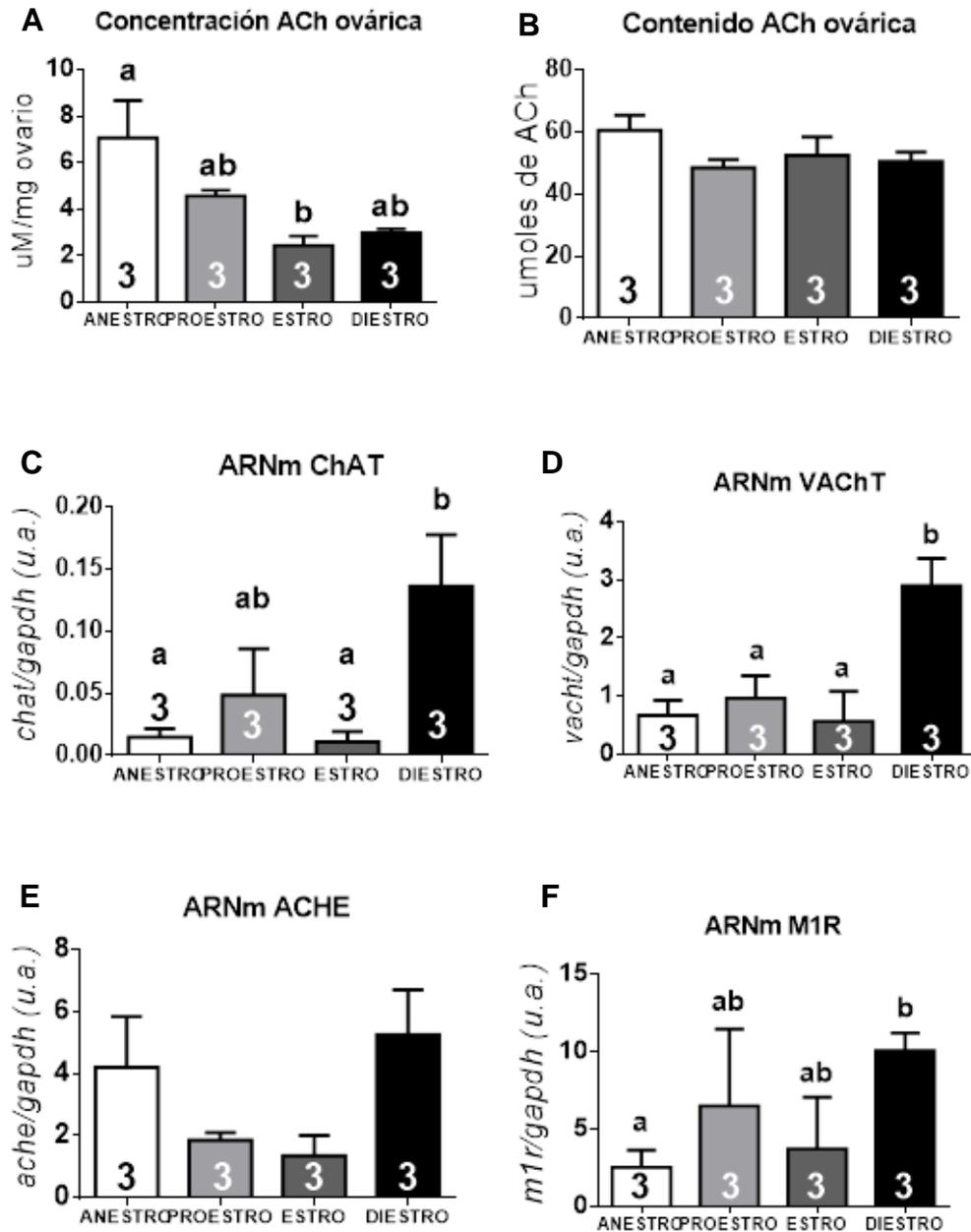


Figura 6: Estudio de sistema colinérgico en la pubertad de la rata Sprague Dawley. Concentración de acetilcolina ovárica (A), contenido de acetilcolina intraovárica (C) y niveles de ARNm de componentes del sistema colinérgico intraovárico (c-g) en ratas prepuberes (26 días), proestro, estro y diestro (edad cercana a la primera ovulación). Los partidores y condiciones para el RT-PCR semicuantitativo de ACHE y los receptores muscarínicos fueron utilizados conforme a lo implementado en el laboratorio (proyecto de tesis de Andrés Azócar y Raúl Riquelme). Todos los valores corresponden al promedio \pm EEM ($n=3$ de cada grupo). Análisis estadístico de ANOVA de una vía, $p < 0,05$ y test a posteriori de Tukey de comparaciones múltiples.

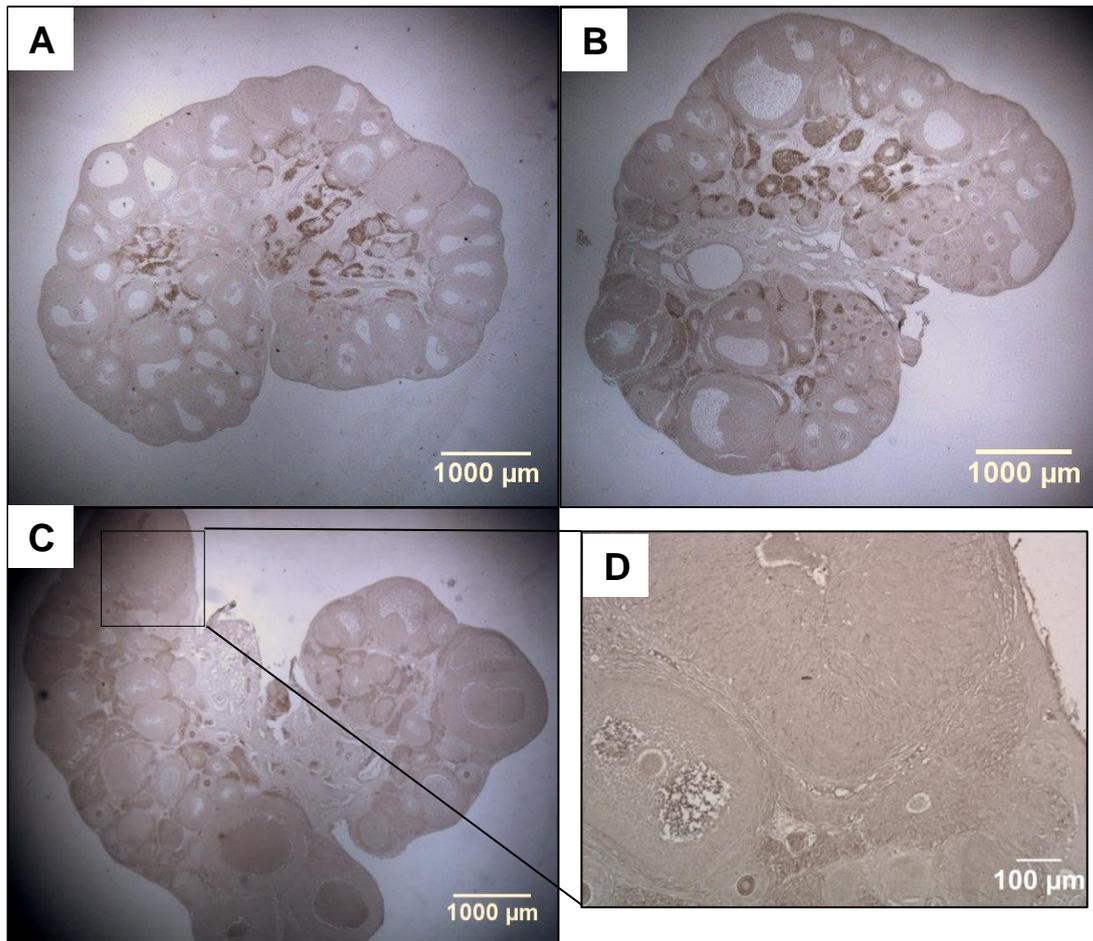


Figura 7 Inmunoreactividad positiva para anticuerpo anti-ChAT. Dilución 1/100. Edad/periodo de la pubertad rata: A Anestro (26 días); B, Proestro; C, diestro; D, diestro (amplificación).

4.2. Efectos en el sistema colinérgico del tratamiento *in vivo* con NGF

4.2.1. Aumento de NGF mediado por EV

Se ha descrito que el tratamiento con EV induce un aumento de NGF a los 30 días, lo que se traduce posteriormente en un aumento en la TH, la enzima limitante en la biosíntesis de NA. Al estudiar los niveles de ACh en estos animales, encontramos que a los 30 días, junto con el aumento de NGF, se encontró un aumento de ACh (Fig.8). Este resultado fue concordante con lo descrito recientemente en el trabajo de Riquelme, en donde el estrés por 30 días, junto con inducir un aumento de NGF (Dorfman et al., 2003), produce un incremento en los niveles de ACh (Riquelme et al., 2019). Sin embargo, debido al efecto dual de EV sobre ambos sistemas (Lara et al., 1993), es que estudiamos protocolos en los que había un aumento de NGF.

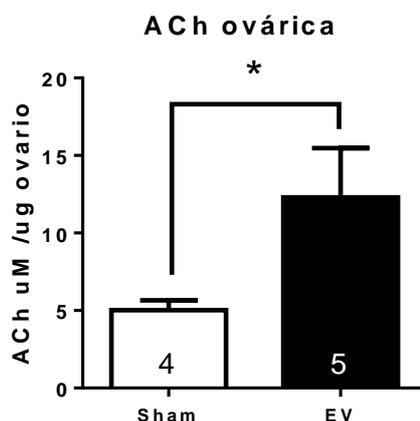


Figura 8: Efecto del EV en la ACh ovárica. La estimulación con EV durante 28 días produce un incremento significativo de ACh. Todos los valores corresponden al promedio \pm EEM ($n=4$ para grupo sham; $n=5$ para grupos Valerato de estradiol). Análisis estadístico de Mann-Whitney de una vía, $*p < 0,05$.

4.2.2. Aumento de NGF por denervación quirúrgica y farmacológica

Inicialmente, para determinar los efectos *in vivo* de NGF sobre el sistema colinérgico, utilizamos un modelo de aumento endógeno de los niveles de NGF intraovárico: la denervación. En este sentido, se sabe que la denervación ovárica inducen un aumento en los niveles de NGF endógenos, a corto plazo (SONX) (Lara et al., 1990a) y largo plazo (tratamiento farmacológico con guanetidina) (Lara et al., 1990b).

4.2.2.1. Denervación quirúrgica de nervio ovárico superior (SONX)

Se ha descrito que en ratas prepúberes, la denervación produce un incremento en los niveles de NGF después de 6 días (Lara et al., 1990a). Para corroborar esto y

determinar si hay cambios en los niveles de ACh, se denervaron ratas prepúberes de 21 días de edad. Como control del proceso, determinamos que efectivamente hubo una reducción en los niveles de noradrenalina ováricos (Fig.9A). Sin embargo, luego de 6 días, no encontramos cambios en los niveles de NGF por medio de kit ELISA (Fig.9B). Se ha descrito que en el ovario de rata, se puede encontrar una forma inmadura de NGF, proNGF, que también tiene efectos propios y por lo tanto cabe la posibilidad de que los cambios descritos anteriormente no distingan entre una u otra forma. Ya que por medio de ELISA no fue posible distinguir entre una y otra forma, se implementó la determinación por Western Blot de la proteína NGF, con una dilución de 1/250 del anticuerpo de acuerdo a lo recomendado por el fabricante, para poder distinguirlos por la diferencia entre los pesos moleculares de uno y otro (NGF: PM= 15 kDa vs proNGF: PM= 18 kDa) en un gel de poliacrilamida al 20%. Se utilizó suero bovino al 10% para bloquear las marcas inespecíficas. Al analizar las membranas, tampoco se encontraron cambios significativos en ninguna de los tamaños de banda estudiados (Fig. 9D), así como tampoco en los niveles de ACh (Fig.9C).

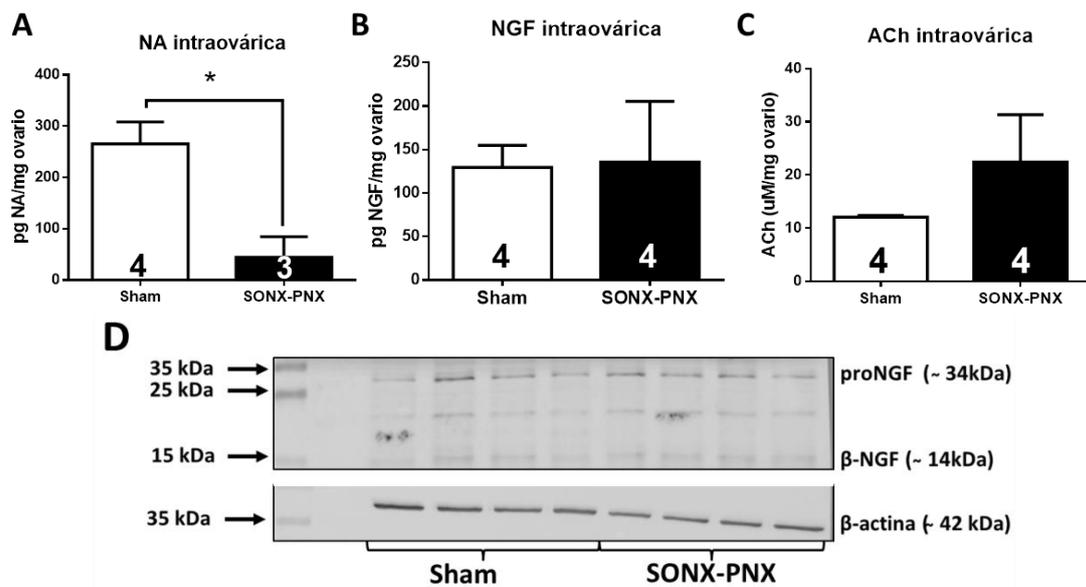


Figura 9: Efectos de la denervación SONX en NA, NGF y ACh en ovario de rata. A. Disminución significativa de NA (control del experimento). No hay cambios en NGF ni ACh (B-C). Todos los valores corresponden al promedio \pm EEM ($n=4$ de cada grupo). Análisis estadístico de *t*-student no pareado, $p < 0,05$.

4.2.2.2. Denervación farmacológica con guanetidina

Guanetidina es un agente bloqueante de neuronas adrenérgicas, cuya administración crónica a altas dosis causa la destrucción de las neuronas simpáticas periféricas, sin afectar otros tipos celulares (Manning et al., 1983). Después de tres meses de terminado el tratamiento, los animales no mostraron mayores cambios en el peso, tal como se ha descrito antes (Garrido et al., 2018). Tal como se esperaba, el

tratamiento produjo una disminución de noradrenalina ovárica (Fig.10A). Sin embargo, no encontramos que los niveles de NGF cambiaran, ni por ELISA ni por WB (Fig.10B y C). De todas formas se determinaron los niveles de ACh y actividad ACHE, sin encontrar cambios (Fig.10D y E).

Debido a que no se pudieron aumentar de forma significativa los niveles de NGF endógenos ni a corto ni a largo plazo, es que se decidió realizar un tratamiento farmacológico con NGF.

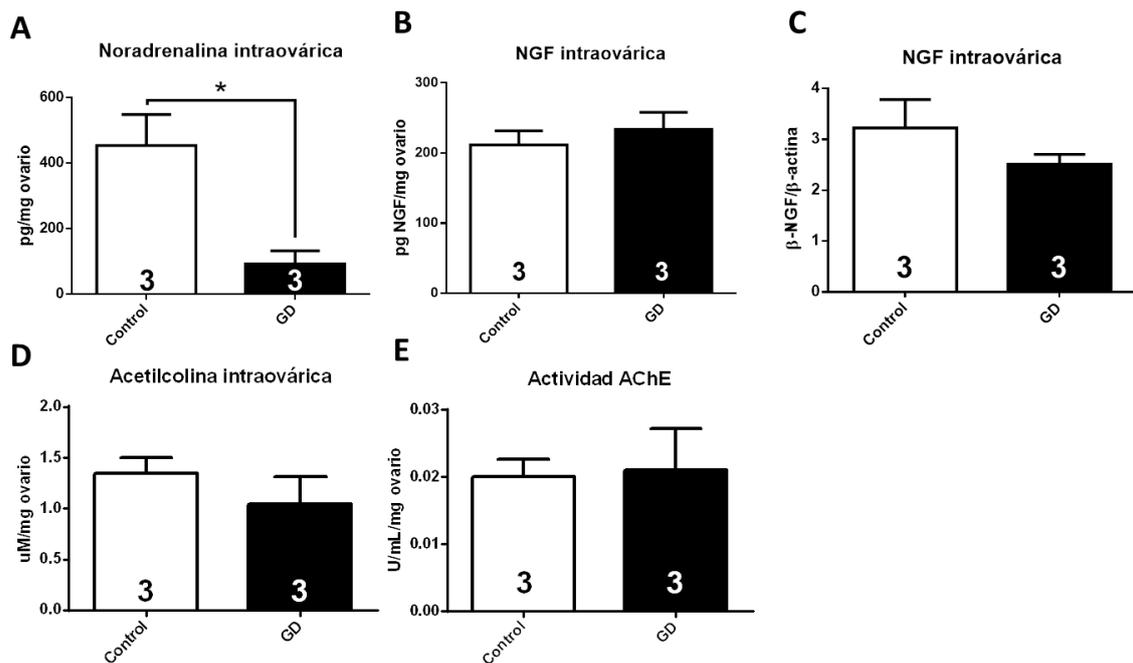


Figura 10: Efectos de la denervación química con guanetidina (GD) en NA, NGF, ACh y ACHE en ovario de rata. A. Disminución significativa de NA (control del experimento). No hay cambios en NGF ni ACh ni ACHE (B-D). Todos los valores corresponden al promedio \pm SEM ($n=3$ de cada grupo). Análisis estadístico de *t*-student no pareado, $p < 0,05$.

4.3. Tratamiento farmacológico in vivo con 100 ng/mL de NGF

Ratas de 3 meses de edad fueron tratadas con 100 ng/mL de NGF por medio de la implantación de una minibomba osmótica. Para evitar efectos compensatorios del ovario remanente, los animales fueron hemiovariectomizados. No se encontraron diferencias en el peso de los animales al final de los 28 días de tratamiento (Sham= 311,3 \pm 8,147 g vs NGF= 298,3 \pm 12,91 g [n.s]). NGF *in vivo* tiene efectos tróficos en las neuronas que inervan el tejido ovárico (Dissen et al., 2009), tal como determinamos con el aumento en los niveles de la enzima tirosina hidroxilasa (Fig.11A y B). Cuando

determinamos los niveles de ACh, encontramos una disminución después de los 28 días de tratamiento (Fig.11C). Estos resultados fueron reafirmados cuando comparamos estos ovarios con los obtenidos al inicio por ULO (ovario inicial), donde se determinó que los ovarios tratados con NGF tienen una concentración menor (Fig.11D).

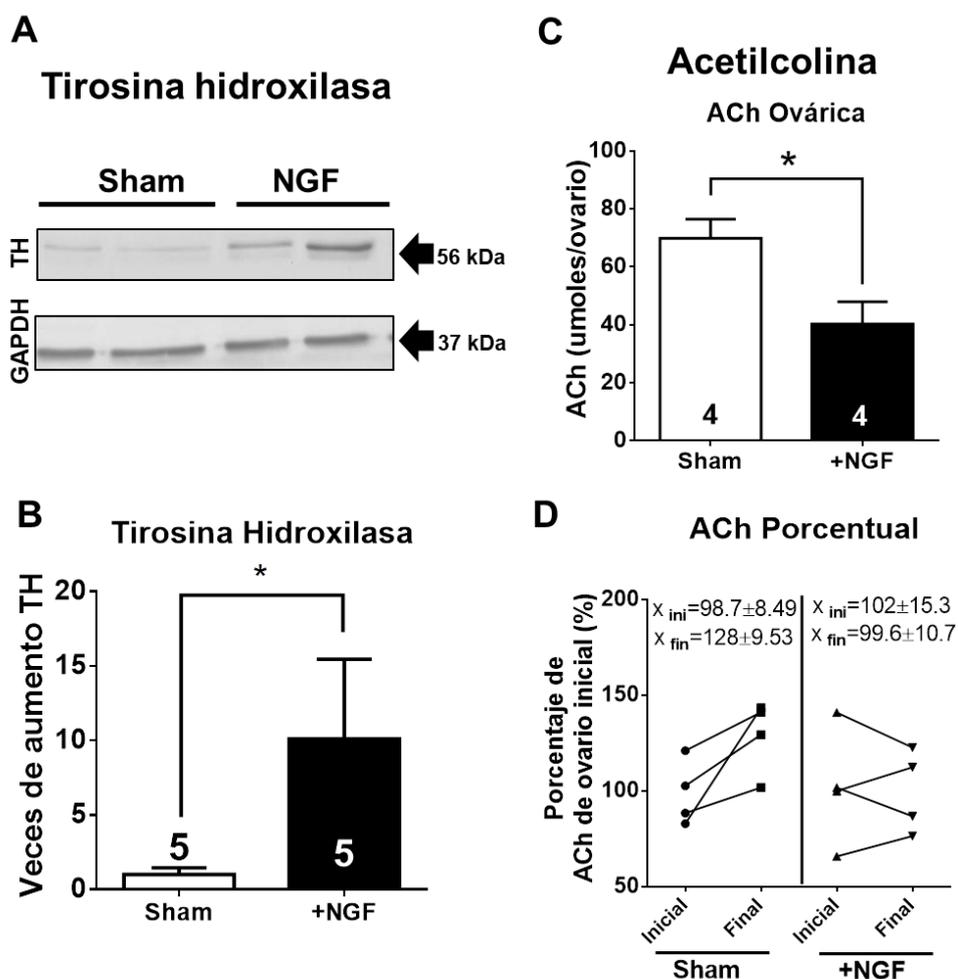


Figura 11: La administración *in vivo* de NGF intraovárico aumenta los niveles de TH y disminuye la acetilcolina. Sham, animales expuestos a cirugía sham; y NGF, animales expuestos a 100 ng/mL de NGF infundido localmente al ovario por medio de la minibomba osmótica. Análisis de western blot de tirosina hidroxilasa (56 kDa) y GAPDH en el ovario. Se muestran membranas representativas de cada proteína. (B) Gráfico de barra muestra la cuantificación de los niveles de TH en comparación a GAPDH en cada condición. Los pixeles fueron contados usando el software ImageJ (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EE.UU). (C) Niveles disminuidos de ACh ovárica. Test *t*-student no pareado. Ningún cambio se encontró en el peso de los ovarios después de 28 días de tratamiento entre grupo sham y NGF (sham = $74,61 \pm 8,189$ mg; NGF = $52,78 \pm 10,44$ mg). (D) Una disminución porcentual en los niveles de ACh después del tratamiento con NGF relativo a los niveles iniciales – ovario inicial corresponde al ovario contralateral que fue removido en el día 0: Sham Sham = $128 \pm 9,53\%$ vs. NGF = $99,6 \pm 10,7\%$. **P* < 0.05, test Chi-cuadrado. Todos los valores corresponden al promedio \pm SEM (*n*=5 de cada grupo), **P* < 0.05.

Ya que la disminución de ACh podría ser mediado por un aumento en la enzima ovárica que la biodegrada, ACHE (Blohberger et al., 2015), determinamos sus niveles por medio de WB. Tal como se puede ver en la Fig.12A, se encontraron dos

tamaños de bandas principalmente y se encontró un aumento significativo para la de 70 kDa. En este sentido, cabe señalar que en ovario se han descrito dos isoformas, R y S (Urrea et al., 2016), y con distintos tamaños de bandas para cada una. Sin embargo, no contamos con un anticuerpo que distinga entre ambas isoformas en rata (Riquelme, 2019). A pesar de los cambios descritos para ACHE (Fig.12B y C), no encontramos cambios en la actividad colinesterasa, tal como se observa en la Fig.12D. Por lo tanto, los cambios observados pareciera que no se relacionaron directamente con un aumento de la biodegradación de ACh.

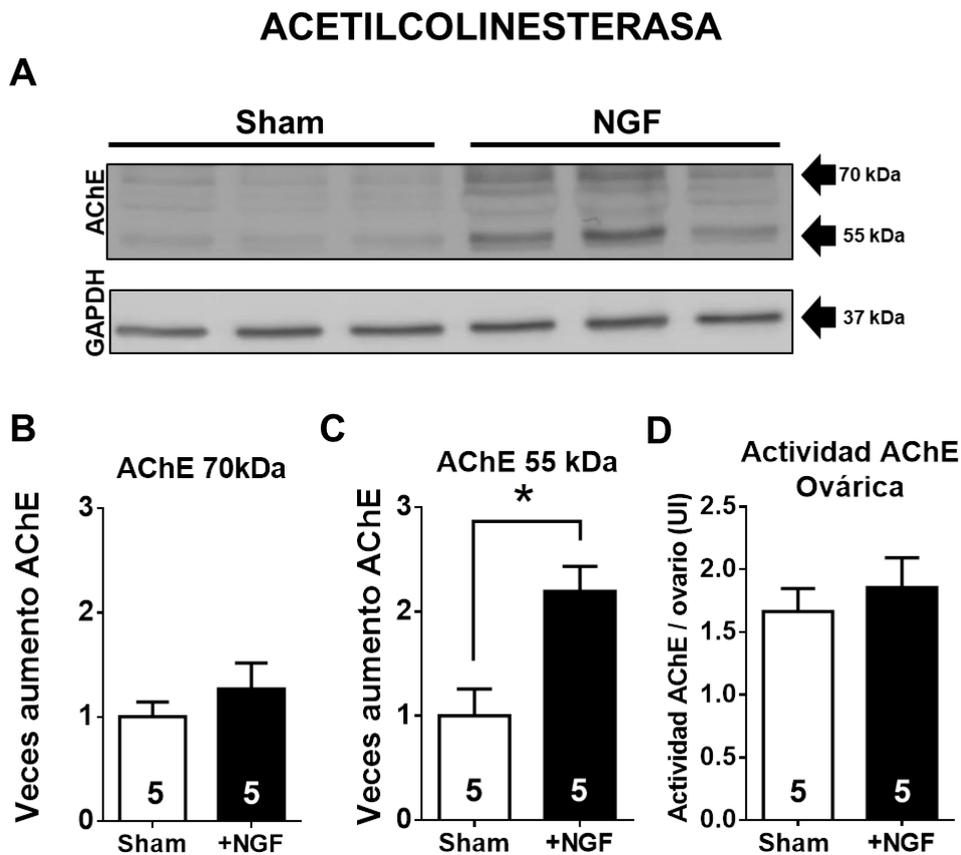


Figura 12: Análisis por western blot reveló que la isoforma de 55 kDa de ACHE aumenta luego del tratamiento *in vivo* con NGF. (A) Análisis de western blot de ACHE y GAPDH en el ovario. Se muestran membranas representativas de cada proteína, y dos bandas de tamaño 50 kDa y 70 kDa fueron identificadas. GAPDH fue usado como control de carga. (B) Gráfico de barras que muestran de la cuantificación de los niveles de proteína de ACHE isoforma de 55 kDa. ** $P < 0,01$, test Mann-Whitney no pareado. (D) La actividad de ACHE ovárica no fue afectada. Todos los valores corresponden al promedio \pm SEM ($n=5$ de cada grupo), * $P < 0,05$, test *t*-Student no pareado.

Tal como se comentó antes, el tratamiento *in vivo* con NGF se realizó por medio de la implantación de una minibomba osmótica. Aunque el tratamiento fue local, NGF tuvo otros efectos tales como el aumento de TH de las neuronas simpáticas que inerva el ovario y que podrían estar afectando los resultados de NGF sobre las células productoras de ACh.

4.4. Efectos de tratamiento *in vitro* con NGF

Para determinar los efectos de NGF locales en el sistema colinérgico ovárico, se obtuvieron ovarios de ratas prepúberes de 26 días y se determinaron los niveles de ARNm de ChAT y VAcHT luego de 3 y 24 hrs de incubación con 100 ng/mL de NGF. Se encontró que a las 3 hrs el tratamiento produjo un aumento de cuatro veces de ambos ARNm en comparación al grupo control (Fig.13A y B). También se midieron los niveles de ACh y se observó que en este mismo tiempo existía un aumento discreto pero no significativo de ACh (Fig.13C). Además, se observó la disminución en los niveles de ACh en el medio de incubación (Fig.13D). Es decir, NGF estaría estimulando la biosíntesis de ACh vía ChAT, pero pareciera requerir más tiempo para que los cambios a nivel molecular lleguen a incrementar los niveles del neurotransmisor. Sin embargo, está reportado que después de 72 hrs de incubación se produce luteinización en el ovario (Richards et al., 1986).

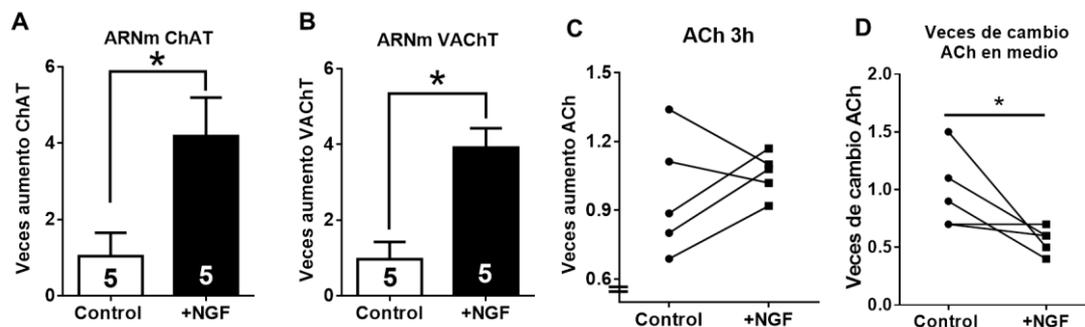


Figura 13: Incubación *in vitro* de NGF aumenta ARNm de ChAT y VAcHT pero disminuye la ACh en el medio. Medios ováricos fueron incubado en buffer Krebs por 3 hrs: Control, incubado solo en medio; NGF, incubado con 100 ng/mL de NGF. (A,B) Veces de aumento en la expresión de ARNm de ChAT y VAcHT después de la incubación con NGF. ARNm de GAPDH fue usado como gen control endógeno. (C) Un leve pero no significativo aumento fue encontrado en los niveles de ACh en el 60 % de los animales. (D) Veces de cambios de ACh en medio de incubación. Todos los valores corresponden al promedio \pm SEM ($n=5$ de cada grupo).

4.5. Efecto del aumento de NGF y disminución de ACh en la función ovárica

Está descrito que el tratamiento crónico con NGF produce alteraciones en el desarrollo folicular normal. El tratamiento disminuyó el número de ciclos estrales (Fig.14), tal como se ha descrito antes (Dissen et al., 2000; Dissen et al., 2009). Encontramos que el tratamiento produjo la promoción de la vía atrésica y quística por sobre la vía sana (Fig.15). Estos cambios también se ven en la reducción del número de ciclo estrales, que son el reflejo del número de ovulaciones de las ratas, y en el número de cuerpos lúteos más grandes (Fig.16). El tratamiento también llevó a una

reducción en los niveles de progesterona (Tabla 3). Ningún cambio se encontró en los niveles de androstenediona, testosterona y estradiol.

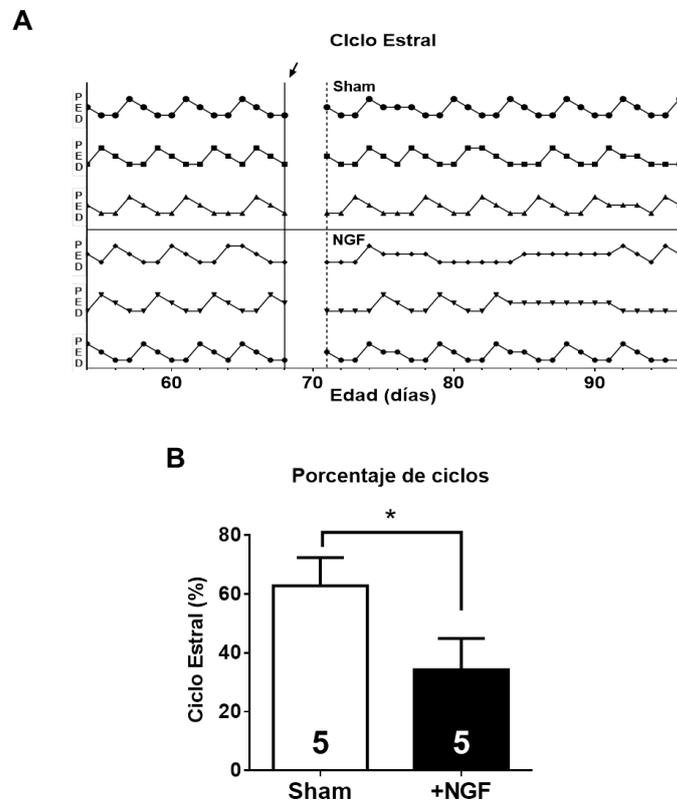


Figura 14: La ciclicidad estral fue afectada por una administración *in vivo* de NGF. El peso de los animales después de 28 días de tratamiento fueron: Sham $311,3 \pm 8,147$ g vs. NGF $= 298,3 \pm 12,91$ (n.s.). (A) Se muestran tres perfiles representativos de ciclo estral antes (14 días) y durante el tratamiento (28 días) por cada condición (flechas indican la implantación de minibomba osmótica o la cirugía sham). Eje vertical describe las diferentes etapas del ciclo estral. (B) Cada barra representa el número de ciclos estrales estimados como el paso regular desde proestro (P) a estro (E) seguido por diestro (D) en los días de observación. Todos los valores corresponden al promedio \pm SEM ($n=5$ de cada grupo). * $P<0,05$, test t-Student no pareado.

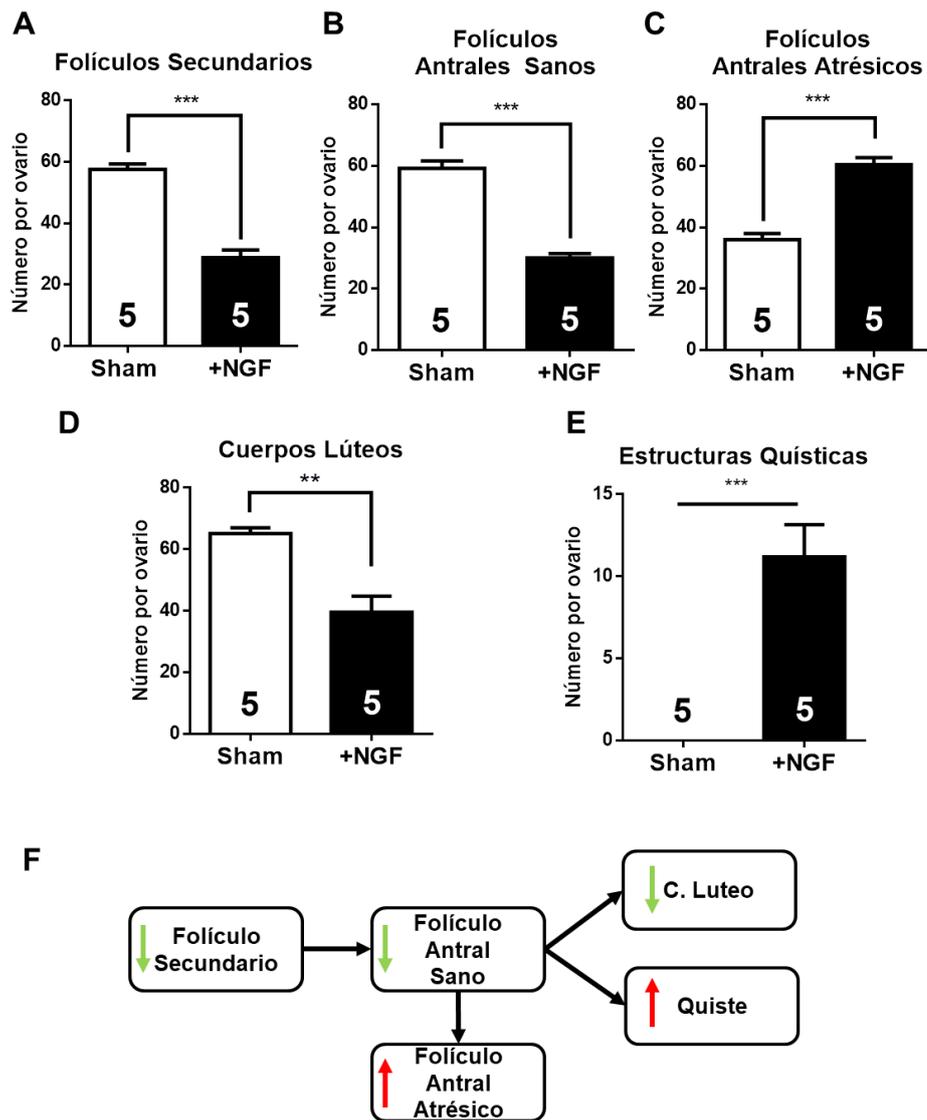


Figura 15: Análisis morfométrico de los ovarios después de la exposición intrabursal durante 28 días con 100 ng/mL de NGF. La dinámica folicular alterada fue encontrada en animales tratados con NGF: se observó la disminución en número de folículos secundarios (A) y antrales sano (B), un aumento en el número de folículos antrales atrésicos (C), aumento en cuerpos lúteos (D) y la aparición de estructuras quísticas (E). (F) Resumen de los cambios en el desarrollo folicular. Todos los valores corresponden al promedio \pm SEM ($n=5$ de cada grupo). (A)(B)(C)(E) $***P < 0,001$ (D) $**P < 0,01$, test t-Student no pareado.

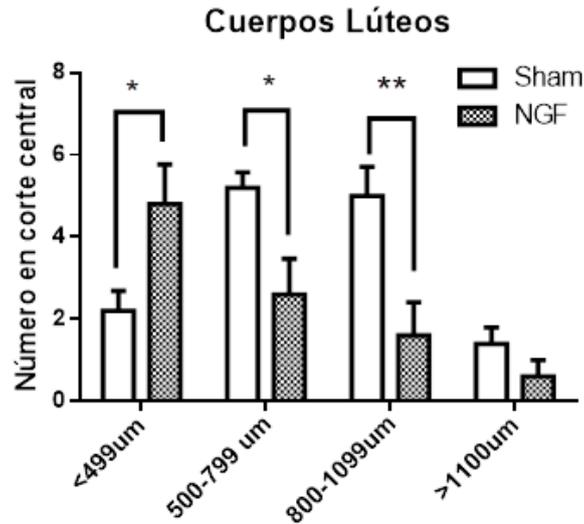


Figura 16: Efectos de NGF en el tamaño de los cuerpos lúteos. Los de tamaño menor a 499 µm fueron aumentados por el tratamiento con NGF, y los de 500-1099 µm, fueron disminuidos. Todos los valores corresponden al promedio \pm SEM ($n=5$ de cada grupo). Análisis estadístico de ANOVA de una vía, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; y test a posteriori de Tukey de comparaciones múltiples.

Tabla 3: Concentración plasmática de progesterona, androstenediona, testosterona, y estradiol después tratamiento NGF

Hormona	Sham	NGF
Progesterona (ng/mL)	10.8 \pm 1.9	4.5 \pm 1.8 (*)
Androstenediona (ng/mL)	0.33 \pm 0.2	0,29 \pm 0.1
Testosterona (ng/mL)	0.32 \pm 0.1	0.24 \pm 0.1
Estradiol (ng/mL)	22.3 \pm 2.6	26.3 \pm 5.0

Los resultados corresponden a 5 animales en cada condición y son expresadas como valor promedio \pm EEM. * $P < 0,05$, test t-Student no pareado.

4.6. Efecto de carbacol en el sistema colinérgico ovárico

La reducción en ACh que produjo el tratamiento *in vivo* con NGF podría estar relacionada con el desarrollo folicular. Para determinar esto, utilizamos carbacol, un agonista colinérgico muscarínico no degradable por ACHE, y se realizó el tratamiento local durante 4 semanas por medio del uso de minibomba osmótica. Resultados previos de nuestro laboratorio han mostrado que ACh produce una promoción de la vía sana en la dinámica folicular, junto con una reducción en el número de quistes (Araya, 2020; Urra et al., 2016). Cuando estudiamos los efectos sobre el sistema colinérgico, no encontramos cambios en la ACh. Interesantemente, al determinar los niveles de ACHE, el tratamiento produjo una disminución significativa de la proteína en la banda de 100 kDa, pero que fue acompañado por un aumento en la actividad ACHE.

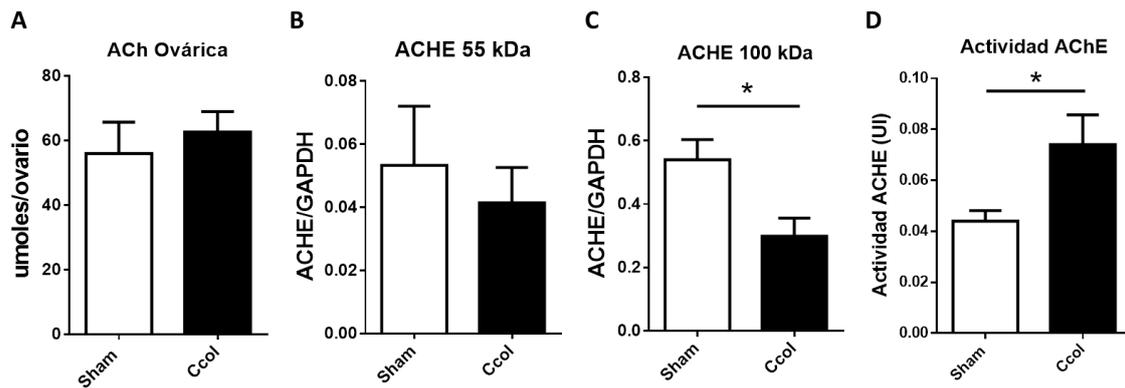


Figura 17: Efectos del tratamiento *in vivo* con carbacol en el sistema colinérgico ovárico. Sham, animales expuestos a cirugía sham; y NGF, animales expuestos a 100 ng/mL de NGF infundido localmente al ovario por medio de la minibomba osmótica. (A, B) No se encontraron cambios en ACh ni ACHE isoforma de 55 kDa. (C, D) NGF produjo una disminución en ACHE isoforma 100 kDa, en cambio, un aumento en la actividad colinesterasa. Todos los valores corresponden al promedio \pm SEM ($n=5$ de cada grupo). * $P<0,05$, test t-Student no pareado.

Se sabe que el tratamiento no produce cambios en la ciclicidad estral (Araya, 2020). El análisis morfométrico de los ovarios después de la exposición a carbacol no mostró cambios en el número de folículos antrales sanos, pero aumentó el número de cuerpos lúteos y disminuyó las estructuras quísticas (Araya, 2020). Respecto a los marcadores colinérgicos, aunque se encuentra la actividad catalítica de ACHE estimulada, aparentemente mediado por el incremento de la isoforma de 100 kDa, no se encontraron cambios en los niveles de ACh (Fig.17). En general, se podría decir que se encontró un claro efecto de la estimulación colinérgica sobre el desarrollo folicular, en donde el desbalance del sistema autónomo dual hacia la vía colinérgica promueve la función ovárica (Fig.18).

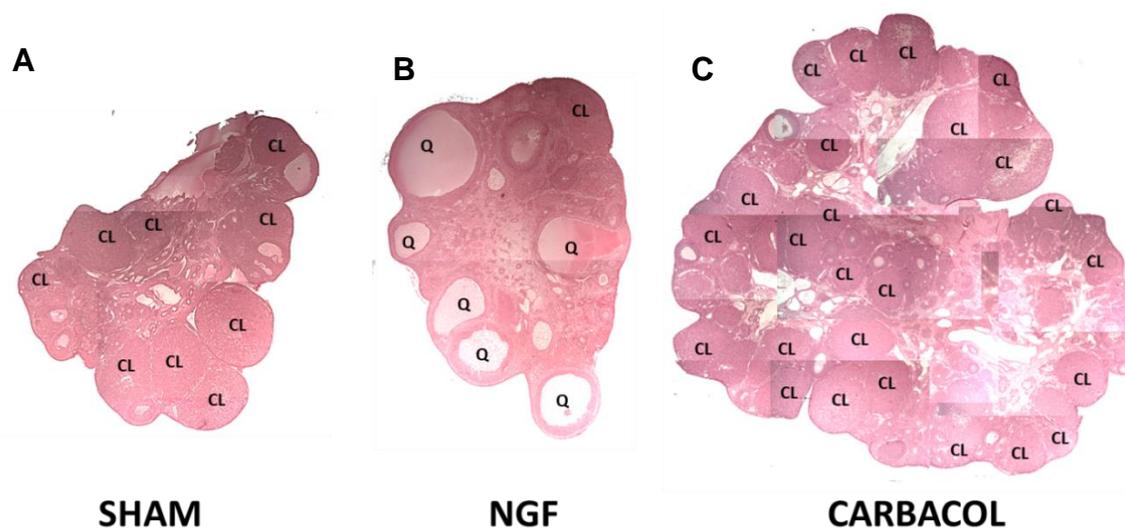


Figura 18: Apariencia morfológica de los ovarios tratados con 100 ng/mL de NGF o 100 μ M de carbacol durante 28 días. Se muestra una imagen representativa para cada grupo (A-C). Se observa la aparición de estructuras quísticas (Q) por el tratamiento con NGF (B) y el incremento en el número de cuerpos lúteos (CL) por el tratamiento con carbacol (C).

5. DISCUSIÓN

La evidencia reciente sugiere la existencia de un sistema colinérgico intraovárico, cuyo rol es relevante en la función ovárica (Du et al., 2018; Riquelme et al., 2019, 2021). El desbalance entre la vía simpática y la colinérgica puede llevar a condiciones patológicas, tales como las inducidas por el tratamiento con EV, un modelo de PCOS (Brawer et al., 1986; Lara et al., 2000; Sotomayor-Zarate et al., 2008), en donde las fibras simpáticas que inervan el ovario están activadas de forma crónica y participan en el establecimiento de la condición de éste síndrome. A pesar de lo sabido sobre la importancia de ACh en el mantenimiento de la homeostasis del órgano, no es claro cómo se regula su producción dentro del ovario. Recientemente, descubrimos que la estimulación simpática crónica por estrés estimula el sistema colinérgico intraovárico (Riquelme et al., 2019). En este trabajo encontramos que el EV también produce un aumento en los niveles de ACh. La observación más importante de todo nuestro trabajo fue el efecto estimulador de NGF *in vitro* en el aumento de las enzimas metabólicas que participan en la biosíntesis y almacenamiento de ACh intraovárico. Este efecto fue replicado en la enzima que degrada ACh, ACHE, después del tratamiento *in vivo* a largo plazo. El hecho de que el tratamiento *in vivo* con NGF no indujese un aumento *in vivo* de ACh, llevó a un desbalance en los sistemas simpático/colinérgico, resultando en un desarrollo folicular aberrante con una disminución concomitante en los niveles de plasmáticos de progesterona. De esta forma, en este trabajo postulamos que NGF estimula el sistema colinérgico y la producción de ACh en el ovario de la rata. Además, lo postulamos como un regulador dual del control autónomo ovárico, que sería esencial para el mantenimiento de la homeostasis del órgano.

5.1. Determinación de ARNm de ChAT mediante RT-qPCR y la distribución de la proteína de ChAT en el ovario de rata

No conocíamos de trabajos previos en los que se haya encontrado un par de partidores para ARNm de ChAT y que hayan sido útiles en ovario de rata, llegando a plantearse la posibilidad de que en el ovario existiría un empalme alternativo (Fritz et al., 1999). Por lo tanto, inicialmente se implementó la determinación del ARNm de ChAT en ovario en rata a partir de partidores previamente publicados para otros tejidos, teniendo éxito con el par descrito en el trabajo de Soret y colabs. (Soret et al., 2010), reafirmando el hecho de una producción intraovárica de ACh. A partir de estos partidores, estudiamos la distribución de *chat*, y corroboramos que es similar a la descrita antes para la proteína ChAT (Fritz et al., 1999), ya que se encontró una mayor

cantidad del ARNm en la fracción enriquecida en CGs que en el resto del ovario (células de la teca y estroma).

Respecto a la proteína ChAT, se estudió inicialmente por medio de western blot ya que existían trabajos previos en los que se estudiaron los efectos de NGF mediante ésta técnica: una de las ventajas es la posibilidad de analizar distintas proteínas que se pueden encontrar en el ovario en una misma membrana, tal como la ACHE. Sin embargo, técnicamente no obtuvimos resultados satisfactorios y no se pudo determinar certeramente la proteína, a pesar de que se probaron dos anticuerpos de origen y características distintas, usando diferentes concentraciones y probando distintos tratamientos para el bloqueo de las marcas inespecíficas. Por lo tanto, no fue posible corroborar los resultados antes publicados mediante ésta técnica (Meinel et al., 2015). Creemos que a diferencia de las células luteales bovinas, el ovario de rata no presenta una gran cantidad de ChAT y por eso no la pudimos detectar en el homogenizado. Para corroborar esta información, sería conveniente analizar los homogenizados de ovario utilizando los mismos anticuerpos de publicaciones anteriores (Fritz et al., 1999; Meinel et al., 2015). Lamentablemente, no se encuentran disponibles comercialmente. Por lo tanto, en un próximo trabajo, debería considerarse trabajar con las CGs aisladas para aumentar la sensibilidad del ensayo. Como alternativa para alcanzar los objetivos propuestos, se implementó la determinación de ChAT por IHQ, en donde tuvimos resultados interesantes: tal como se mencionó más arriba, estudios previos indican que la proteína se expresa principalmente en CGs y abundantemente en los folículos antrales grandes sanos en ovario de rata (Fritz et al., 1999). Sin embargo, en este trabajo no fue posible reproducir tales resultados, encontrando inmunoreactividad positiva específica en las CGs de folículos atrésicos, ovocitos e, incluso, estroma. Estos resultados también son discordantes con los estudios en otras especies (*Mono rhesus* y *Homo sapiens sapiens*) en donde también se ha demostrado la presencia de ChAT en las CGs (Du et al., 2018; Meinel et al., 2015). Tal como se mencionó más arriba, los anticuerpos utilizados en esos trabajos no se encuentran disponibles comercialmente. Por lo tanto, al respecto, solo queda mencionar que en estas publicaciones no se indicó el uso del anticuerpo preadsorbido, necesario para validar el ensayo y confirmar la especificidad de la marca hallada. Ahora bien, a pesar de que en nuestro análisis se evaluó la especificidad de la inmunoreactividad por medio del uso del péptido de bloqueo recomendado por el proveedor, la información que aportan estos resultados difiere significativamente de los conocimientos que se tienen respecto al funcionamiento del sistema colinérgico: Por ejemplo, el hecho de que dentro de un folículo en crecimiento solamente el ovocito

sintetice ACh propone que la ACh debe atravesar todo el folículo para estimular la c/s de la teca en la periferia del folículo y estimular la ovulación, algo poco factible si se considera que en el fluido folicular se encuentra la ACHE, enzima que tiene una alta actividad catalítica de degradación del neurotransmisor (aprox. 25.000 moléculas de ACh por segundo) y que se ha descrito que está presente en las membranas de las CGs y en el mismo líquido folicular (Blohberger et al., 2015; Urra et al., 2016). Además, la presencia de ChAT solamente en folículos atrésicos no tendría relación con el hecho de que el aumento de ACh se correlaciona estrechamente con una promoción del desarrollo folicular, reflejado por un aumento en los folículos secundarios y los cuerpos lúteos (Du et al., 2018; Urra et al., 2016). Se ha planteado el rol auto- y paracrino de la ACh dentro de los folículos debido a la presencia de los receptores muscarínicos en las mismas células productoras (GCs). Ahora bien, si efectivamente ACh fuera producido por los folículos atrésicos y por el estroma, ésta molécula tendría un rol principalmente autocrino que podría funcionar como una señal de muerte celular dentro del folículo, lo que no tiene relación con todas las funciones planteadas hasta ahora. En este sentido, aunque en la misma promoción del desarrollo folicular también se ha visto el aumento del número de folículos atrésicos (Urra et al., 2016), esto estaría más bien relacionado con la misma estimulación del crecimiento y diferenciación de todos los folículos, siendo la atresia un proceso normal dentro de los folículos que no fueron seleccionados para ovular. A su vez, estos mismos resultados discrepan con lo observado para chat, que se distribuye principalmente en la fracción enriquecida en CG y no en el estroma.

Todos los conflictos que generan estos resultados con la información antes publicada abarcan una amplia gama de diversas explicaciones. Por ejemplo, las discrepancias antes descritas podrían estar relacionadas con el desconocimiento del estadio en el que se encontraban las ratas del trabajo antes publicado (Fritz et al., 1999). La producción de ACh y expresión de sus receptores (muscarínicos) podría cambiar durante el desarrollo, dando cuenta de una dinámica estral similar a la observada con la noradrenalina: Se ha observado un aumento en el contenido de noradrenalina y en el número de sus receptores β durante el desarrollo de la rata (Ricu et al., 2008), asociado específicamente al periodo de la primera ovulación. Además, se ha observado que en proestro tardío del periodo peripuberal hay una mayor respuesta esteroideogénica frente a la estimulación con agonistas adrenérgicos (Aguado et al., 1982). Es en este periodo puberal en donde ocurren distintos cambios fisiológicos que van a promover la maduración del ovario y sus funciones, tal como el primer peak de la hormona luteinizante, apertura vaginal, primera ovulación y la aparición de los

primeros cuerpos lúteos (Leung and Adashi, 2004). Al comparar el estadio peripuberal con los niveles de ACh, resulta interesante que no se haya encontrado una tendencia al aumento de ésta molécula en proestro, que es donde se encuentran formados los folículos periovulatorios, los que deberían producir una mayor cantidad del neurotransmisor según lo descrito antes (Fritz et al., 1999) y, por lo tanto, producir un aumento del neurotransmisor (Cruz et al., 2015). Sin embargo, estos resultados no descartan la posibilidad de que el aumento haya sido discreto y local, y que al analizar un homogenizado de ovario (tal como se hizo en este trabajo) no sea posible detectar este aumento. También se observó la tendencia a la disminución desde el anestro al estro en la concentración de ACh sin cambios en la cantidad de ACh. Esto último podría demostrar que, a diferencia de lo descrito en modelo bovino, los cuerpos lúteos en rata efectivamente no tienen capacidad de síntesis de ACh, algo antes visto por Fritz (Fritz et al., 2001). Resultados similares se encontraron a nivel molecular, con un aumento del ARNm de ChAT en diestro, que podría dar cuenta de la relación entre el tamaño de los folículos antrales en crecimiento y que pronto serán pre-ovulatorios; y con los niveles de ACh, de cambios discretos y locales que no pueden ser detectados por medio del análisis del tejido completo.

De esta forma, los resultados sobre el sistema colinérgico en la pubertad parecieran coincidir, en general, con lo planteado en la literatura hasta ahora. Sin embargo, a pesar de lo sugerente de estos resultados, todos estos fueron parte de experimentos exploratorios ya que se trabajó con un número inicial de 3 animales por grupo. Debido a la posibilidades que se abren para describir los cambios que estarían ocurriendo durante el desarrollo, creemos que se requiere de la caracterización completa del sistema colinérgico intraovárico en las distintas edades del animal. Junto con esto, se requiere determinar la contribución en los niveles de ACh que tiene la inervación vagal ya que a pesar de la evidencia planteada por esta tesis y otros artículos antes publicados, algunos autores plantean que la principal contribución intraovárica sería vía la inervación extrínseca. Esto último se encuentra en estudio en nuestro laboratorio (trabajo en preparación). Ya que el objetivo de este trabajo era evaluar los efectos de NGF sobre el sistema colinérgico, consideramos que toda esta investigación debería ser parte de futuros trabajos en el área y no forman parte del objetivo general ni de los específicos de esta tesis. Por lo tanto, lamentablemente no se pudo obtener la caracterización de la proteína ChAT ni en su distribución intraovárica ni en los cambios que tuvo en los distintos grupos experimentales evaluados en este trabajo. Efecto de NGF sobre los niveles de ACh intraováricos.

5.2. Efecto de NGF sobre los niveles de ACh intraováricos

5.2.1. Valerato de estradiol (EV) induce un aumento de ACh

En neuronas simpáticas, el tratamiento con EV lleva a un aumento en los niveles de noradrenalina y un fenotipo ovárico similar al de PCOS (Del Campo et al., 2019; Lara et al., 1993). Después de 30 días, el EV produce un incremento en NGF y que el receptor de NGF que estaría involucrado sería NGFR en el ovario de rata, ya que se encontró un aumento similar y no hubo cambios para trkA) (Lara et al., 2000). Efectos similares se han visto posterior al implante ovárico de células sobre productoras de NGF y por células transformadas que producen NFG, animales en los que se indujo un fenotipo de PCO (Dissen et al., 2000; Manti et al., 2020). En este sentido, no es sorprendente encontrar cambios dependientes de estrógenos en nervios simpáticos y en neuronas colinérgicas ya que se ha demostrado que los estrógenos convergen con vías de señalización de neurotrofinas (Singh et al., 1999; Toran-Allerand and Sétáló, 1999). Sin embargo, de acuerdo a los antecedentes presentados y a los resultados obtenidos en este trabajo, el aumento de ACh por el tratamiento con EV sería mediado por NGF (Al-Zi'abi et al., 2009; Meinel et al., 2015). Dentro del contexto de hiperinervación del órgano, el aumento de ACh podría proteger a los folículos ováricos de las acciones de una vía simpática sobre-activada (Del Campo et al., 2019; Dissen et al., 2009). Con el fin de explorar ésta hipótesis y los efectos de NGF en las actividades de las enzimas involucradas en la biosíntesis y la degradación de ACh intraovárica, utilizamos enfoques *in vivo* e *in vitro*.

5.2.2. El tratamiento *in vivo* con NGF reduce los niveles de ACh y potencia la producción de la isoforma 55 kDa de ACHE

El tratamiento intrabursal con NGF *in vivo* alteró el ciclo estral, semejante a lo que observó en estudios previos de ovario implantados con células sobre-productoras de NGF (Dissen et al., 2000) o células transformadas que producen NFG (Manti et al., 2020). El NGF administrado localmente activó las neuronas simpáticas, tal como se evidenció por el incremento de la expresión de TH, la enzima limitante en la biosíntesis de NA. Se ha descrito que los ovarios de animales con niveles aumentados de NGF son hiperinervados por fibras catecolaminérgicas, dando un tono simpático aumentado en la glándula (Dissen et al., 2009). Aunque NGF *in vitro* aumentó la expresión de las enzimas involucradas en la biosíntesis de ACh, inesperadamente disminuyó los niveles de ACh, incluso sin cambios en la actividad ACHE.

Encontramos que al comparar el ovario inicial (ovario contralateral recolectado justamente antes de la instalación de la mini-bomba osmótica) con el del final del tratamiento con NGF los niveles de ACh por ovario eran significativamente menores. No tenemos información acerca de los mecanismos de liberación de ACh dentro de las CGs y si estos son regulados por otros factores (Auld et al., 2001). Sin embargo, se ha descrito en cultivos primarios de neuronas colinérgicas que NGF promueve la liberación de ACh (vesicular y espontánea) más rápido que lo que potencia la actividad de ChAT, en una manera concentración- y tiempo-dependiente, hasta 10 días después de iniciado el tratamiento (Auld et al., 2001; Oosawa et al., 1999), lo que podría explicar parte de los resultados encontrados. Un modelo complementario es el propuesto por Riquelme y cols. (Riquelme et al., 2019), quien propuso que la ACh era almacenada en vesículas dentro de las CGs y no sería expuesta a la degradación por ACHE (todo esto en el contexto de estimulación simpática crónica). Sin embargo, la ACh una vez liberada no actuaría en los receptores muscarínicos para ejercer su acción trófica debido a la actividad catalítica aumentada de ACHE. Más investigación es necesaria para tener una mejor comprensión de los mecanismos de liberación y su rol en la actividad colinérgica intraovárica.

Además de lo anterior, se tiene que considerar que los niveles de ACh también son regulados por colinesterasas. Se ha reportado que la actividad colinesterasa ovárica es mediada principalmente por la ACHE (Blohberger et al., 2015), encontrándose las isoformas de ACHE -S y -R en ovario de rata (Urrea et al., 2016). Se sabe que éstas isoformas tienen diferentes características y distribución celular: la isoforma -S es capaz de formar multímeros que se unen a proteínas de anclaje y son parte de la membrana sináptica, mientras que la ACHE-R no se agrupa y es soluble una vez secretada. En estudios de ratones y humanos se ha encontrado que ACHE-S tiene diferentes pesos moleculares (55, 60 y 70 kDa), los que dependerían de modificaciones post-traduccionales (García-Ayllón et al., 2012; Gilboa-Geffen et al., 2007; Montenegro et al., 2017; Silveyra et al., 2008). Por otra parte, el tamaño molecular de ACHE-R es de 55 kDa (García-Ayllón et al., 2012; Gilboa-Geffen et al., 2007; Montenegro et al., 2017). Cuando analizamos ACHE después de la estimulación con NGF, encontramos un incremento de 2 veces pero solamente en la isoforma de 55 kDa. El anticuerpo monoclonal (A11, Santa Cruz Biotechnology) que usamos no discrimina entre ambas isoformas, por lo que no pudimos saber a cuál correspondería (tampoco existe un anticuerpo comercial que permita distinguir entre ambas isoformas en rata). Respecto a estos resultados, es sabido que los niveles de ACHE aumentan para compensar el exceso en ACh en el cerebro, tal como se ha visto en el hipocampo

y núcleo caudado (Imperato et al., 1991; Kaufer et al., 1998). Por lo tanto, es de esperarse que en nuestro estudio hubiera en algún momento el aumento en ACh. En este sentido, se ha descrito que la acción del estrés o de un inhibidor de ACHE lleva a un corte y empalme alternativo que produce un gran aumento del ARNm de ACHE-R (Kaufer et al., 1998). Creemos que este aumento en la masa de la proteína podría estar relacionado con la isoforma -R. Sin embargo, el ARNm de ACHE-R es menos estable que el de ACHE-S (Chan et al., 1998), y su expresión está limitada a la duración de su estímulo. El aumento de ACHE-R es relevante en cuanto a las funciones no tróficas que se han descrito asociadas a la secuencia única de 26 aminoácidos del extremo C-terminal, ARP (Grisaru et al., 2001). Se ha descrito que este fragmento ARP de la AChE-R induce muerte celular activada por quinasas de la vía de la necroptosis en CGs humana (Blohberger et al., 2015). En este trabajo planteamos que habría una relación entre el aumento de la atresia por el tratamiento a largo plazo con NGF y el aumento en ACHE-R, promoviendo la muerte de los folículos vía la necroptosis, un tipo de muerte celular regulada (Blohberger et al., 2015). Esta disminución en el número de folículos contribuiría a la disminución en ACh. Más investigación es necesaria para determinar el mecanismo involucrado en este proceso. NGF aumentó el ARNm de ChAT y VAcHT pero no la producción de ACh *in vitro*.

5.3. NGF aumentó el ARNm de ChAT y VAcHT pero no la producción de ACh *in vitro*

Después de tres horas de incubación del ovario en la presencia de NGF aumentó en alrededor de cuatro veces el nivel de ARNm de ChAT. Este cambio concuerda con los informes previos donde el tratamiento 100 ng/mL de NGF estimula la producción de ChAT en células luteales bovinas y CGs humanas (Al-Zi'abi et al., 2009; Meinel et al., 2015). Tal como se mencionó antes, aunque no se ha establecido que ACh sea almacenada en vesículas, VAcHT se ha encontrado expresada en CGs (Fritz et al., 1999). En modelos neuronales se ha observado que ambas proteínas son expresadas juntas debido a que los genes de VAcHT están localizados en el primer intrón de los genes de ChAT y a que comparten la misma dirección transcripcional (Mallet et al., 1998). Nosotros encontramos un aumento en ARNm de VAcHT después del tratamiento de NGF; por lo tanto, pensamos que el tratamiento aumentaría la expresión de proteínas y que probablemente estimularía la producción y almacenamiento vesicular de ACh. A pesar de estos resultados promisorios, cuando analizamos los niveles de ACh en nuestro modelo *in vitro*, encontramos un leve pero no significativo incremento en el 66 % de las muestras después de 3 hrs de incubación. Tampoco encontramos mayores cambios a las 24 horas del tratamiento de

NGF (no mostrado). En este sentido, cabe señalar que consideramos varios factores en nuestro protocolo experimental: Primero, usamos ovarios de ratas prepuberales para descartar la interferencia de estructuras que no producen ACh en ratas, tales como el cuerpo lúteo (Fritz et al., 1999; Fritz et al., 2001). Además, la incubación *in vitro* de ovarios permitió eliminar la contribución exógena de las fibras neuronales colinérgicas y simpáticas que inervan el órgano. Segundo, nuestro modelo ha demostrado ser útil para evaluar los efectos ováricos de diferentes neuropéptidos, incluyendo NGF (Fernandois et al., 2012; Julio-Pieper et al., 2006; Squicciarini et al., 2018). A pesar de que encontramos una disminución en niveles de ACh en el medio de incubación, esto podría estar relacionado a la mayor liberación de ACh, siendo expuesta a la degradación por ACHE. Tal como se mencionó antes, desconocemos los mecanismos de liberación de ACh, por lo que más investigación es necesaria para resolver este punto. Se ha observado en co-cultivos septohipocampales y cortes hipocampales, que 3 a 4 semanas de estimulación de NGF son necesarias para observar cambios en el neurotransmisor y en la actividad catalítica de ChAT (Gähwiler et al., 1990; Lapchak and Hefti, 1991), por lo que nuestros resultados indicarían que se requeriría un tiempo mayor de estimulación para observar cambios en el neurotransmisor. Sin embargo, tal como se mostró en los resultados, después de 4 semanas de tratamiento *in vivo* se encontró una disminución significativa de los niveles de ACh por razones que se discuten más adelante. Por lo tanto, creemos que una estimulación *in vivo* en un periodo superior a 24 hrs e inferior a 3 semanas sería un periodo de tiempo interesante para evaluar la efectividad de NGF para estimular la producción de ACh.

5.4. El desbalance del sistema colinérgico intraovárico y la vía simpática sobre-activada debido al exceso de NGF intraovárico produce una dinámica folicular alterada

La función ovárica fue alterada en los ovarios de ratas expuestas a NGF. El reclutamiento inicial fue afectado, tal como observa en el número de folículos secundarios reducido. Todo esto a pesar del hecho que NGF promueve su crecimiento y diferenciación (Cordon-Cardo et al., 1991; Dissen et al., 2001; Romero et al., 2002). Dissen y cols. no encontraron cambios en folículos preantrales después de implantar las células productoras de NGF en ovarios de rata. A diferencia de nuestro trabajo, Dissen y cols., presentaron resultados de ovarios tratados por 60 días con NGF, y los mecanismos compensatorios en el reclutamiento inicial podrían ser responsables de la diferencia con nuestros resultados (Dissen et al., 2000). Respecto del reclutamiento cíclico, encontramos una disminución en el número de folículos

antrales sanos y un aumento en los folículos antrales atrésicos. Ya que las CGs de los folículos antrales sanos expresan ChAT (Fritz et al., 1999; Fritz et al., 2001), la reducción en su número podría explicar la reducción en los niveles de ACh después del tratamiento con NGF. El aumento en los folículos antrales atrésicos podría ser un proceso atrésico dependiente de NGF vía su receptor de baja afinidad NGFR (también conocido como p75NTR)(Barrett, 2000). Sin embargo, NGFR es expresado a niveles muy bajos o indetectable en las CGs de ovarios de rata (Dissen et al., 1991); por lo tanto, el incremento de folículos atrésicos podría estar promovido por otras causas, tales como necroptosis. En este sentido, recientemente Du et al. reportaron que el uso de necrostatina, un inhibidor de una quinasa de la vía de la necroptosis, promueve el aumento en el tamaño de los ovocitos y folículos cultivados *in vitro* (Du et al., 2018). En nuestro trabajo planteamos que habría una relación entre la promoción de la atresia por el NGF y el aumento en ACHE-R, promoviendo la muerte de los folículos vía la necroptosis, proceso que además contribuiría a la disminución en ACh. Más información es necesaria para determinar si el tratamiento a largo plazo con NGF produce un aumento específico de la isoforma ACHE-R y que lleve a un incremento de ARP, promoviendo la muerte celular vía necroptosis.

Cruz (Cruz et al., 2015) sugirió que ACh regula la ovulación a través de los receptores muscarínicos. Ahora nosotros reportamos una disminución en el número de cuerpos lúteos, específicamente de los nuevos (grandes) cuerpos lúteos y la acumulación de cuerpos lúteos pequeños. Esta disminución está asociada con una reducción en el número de ovulaciones en comparación al control. Más aún, NGF estimuló la formación de estructuras quísticas. En este sentido, es bien sabido que los quistes producen alteración en la función ovárica, tales como hiperandrogenismo, anovulación, e infertilidad (Dorfman et al., 2003; Fernandois et al., 2012; Lara et al., 1993; Paredes et al., 1998). En general, todos estos cambios muestran que el tratamiento crónico con NGF produce una disminución en la función ovárica, pero no solo por un aumento selectivo en el tono noradrenérgico, sino más bien en ambos neurotransmisores, habiendo una predominancia noradrenérgica debido al aumento en la enzima ACHE y por ende, una reducción de la ACh.

En este sentido, el presente hallazgo no se explica solamente por la hiperactivación de la vía simpática en el ovario. De hecho, 4 semanas de estrés por frío (activación noradrenérgica crónica), que aumenta la noradrenalina ovárica y produce un desarrollo folicular aberrante, induce una disminución en el número de folículos secundarios, cuerpos lúteos y la aparición de estructuras prequísticas (Bernuci et al., 2013; Dorfman et al., 2003; Riquelme et al., 2019), a diferencia de lo

aquí observado, en donde también se ven afectados los folículos antrales. Recientemente, se describió que el estrés crónico por estrés impredecible crónico (CUMS, por sus siglas en inglés) disminuye NGF en el ovario (Fu et al., 2020). Probablemente esto está relacionado con un aumento no específico en los niveles de corticoides así como se ha demostrado que ocurre en el ovario después de estrés por frío/restricción (Paredes et al., 1998). Al respecto, la más importante observación fue que la incubación *in vitro* con NGF revierte los cambios inducidos por CUMS, sugiriendo cambios en el balance de los neurotransmisores inducidos (probablemente, ACh intraovárica) o en la inhibición de la síntesis de corticoides. En este caso, el desbalance en el sistema colinérgico intraovárico podría ser el factor que regula el desarrollo folicular normal, ya que aumentando los niveles de ACh por medio de la inhibición de la ACHE, se potencia el desarrollo folicular y reduce el número de estructuras quísticas (Urrea et al., 2016). En nuestro caso, el desbalance en la producción/degradación de ACh favorece su degradación. Además, el aumento de la isoforma de ACHE de 55 kDa (probablemente ACHE-R), el cual podría producir un incremento de ARP (el que por sí solo promueve la necroptosis)(Blohberger et al., 2015), podría explicar los más profundos efectos de NGF en el desarrollo folicular aberrante (incluyendo la aparición de estructuras prequísticas y quísticas). Todas estas anomalías junto con la vía simpática sobre-activada podrían favorecer la promoción de la vía atrésica y las estructuras quísticas por sobre los folículos sanos.

Nuestro laboratorio ha encontrado evidencia de un efecto regulador de ACh en el desarrollo folicular ovárico por el uso de carbacol, un agonista muscarínico no específico, el cual no es degradado por ACHE (Araya, 2020). Esto explicaría que la concentración de ACh disminuida es la causa de la predominancia del tono noradrenérgico responsable del fenotipo de PCO en la estimulación crónica con NGF. Este fármaco produjo cambios claros en la morfología ovárica, mostrando los resultados de un efecto colinérgico puro; así, la estimulación colinérgica llevó a un aumento en el número de cuerpos lúteos (i.e. ovulación). En este sentido, una disminución en folículos quísticos indica que la activación colinérgica está en balance con la activación simpática. Esos resultados son también apoyados por los experimentos de Urrea y colabs. (Urrea et al., 2016), en el que se demostró que el aumento en ACh intraovárico indujo un aumento en la ovulación y fertilidad. Además, recientemente se ha encontrado que ACh es capaz de revertir el fenotipo tipo PCO inducido por el estrés por frío en ratas (Riquelme et al., 2021). Es interesante el hallazgo que, a pesar de que se ve el aumento de la isoforma ACHE de 100 kDa y de su actividad catalítica, no se vea una disminución de ACh. Se sabe que la producción

de ACHE es regulada por la activación de los receptores muscarínicos. Sin embargo, no es el caso de la liberación. Por lo tanto, en comparación a la estimulación con NGF, carbacol estimularía el desarrollo folicular sin afectar ni el almacenamiento ni la secreción de ACh. A su vez, esto corrobora nuestras sospechas respecto a la posible función de cada una de las isoformas: la de 100 kDa estaría vinculada a la actividad catalítica tradicional; mientras que la de 55 kDa estaría relacionadas a las no-catalíticas (por ejemplo, necroptosis vía su fragmento ARP).

5.5. Nuestros resultados en el contexto conocido de NGF y el sistema colinérgico: el rol dual de NGF

Los resultados *in vivo* e *in vitro* demuestran el papel estimulador de NGF sobre la vía colinérgica (Figura 19). Aunque *in vitro* se observó el efecto local directo sobre los folículos ováricos vía la síntesis de *chat*, *in vivo* la estimulación a largo plazo de ambas vías (extrínseca, vía las fibras simpáticas que inervan el órgano; y la intrínseca, del sistema colinérgica intraovárica) produjo una hiperinervación del órgano, en donde primaron los efectos aberrantes sobre el desarrollo folicular.

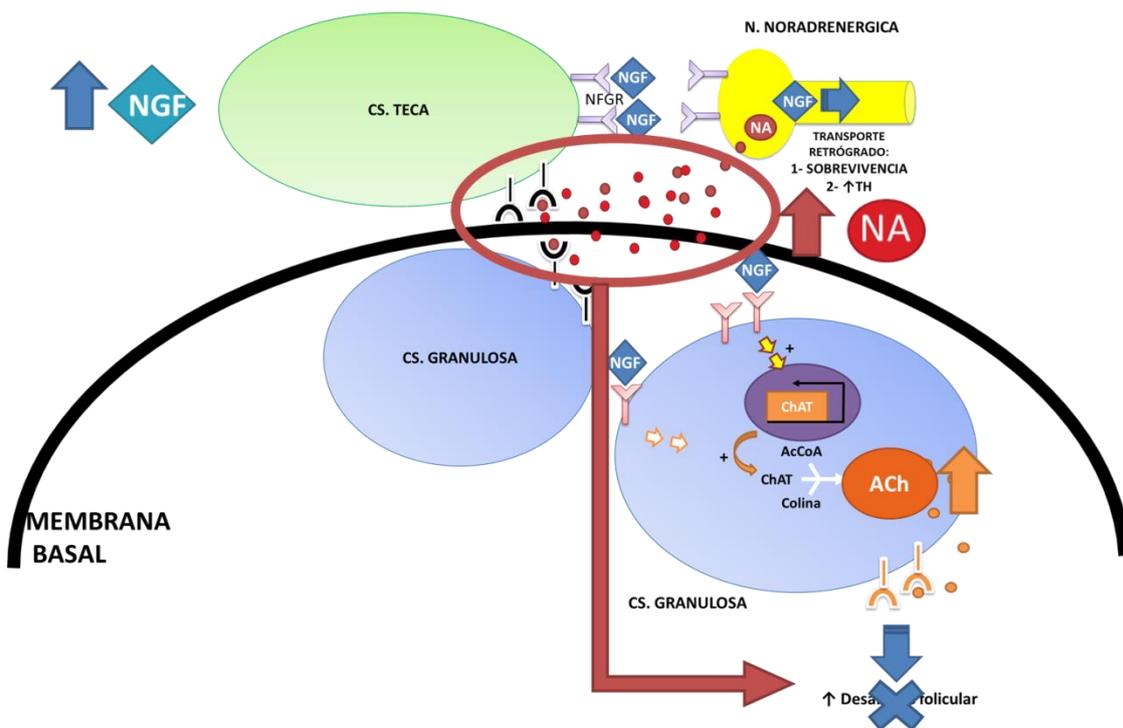


Figura 19: Resumen de los resultados obtenidos.

A partir de los resultados encontrados, podemos decir que la producción de ACh intraovárica es inducida por NGF vía el aumento de la síntesis de ChAT (Figura 20). A pesar de que no podemos descartar la contribución nerviosa del nervio vago (Linares et al., 2021), nuestros resultados indican que el principal productor de ACh

sería el ovario, tal como se pudo ver al tratar crónicamente con NGF, en donde la disminución de los niveles de ACh se vio acompañado por el decrecimiento en el número de folículos ováricos (folículos secundarios y antrales sanos). En este sentido, se sabe que las fibras colinérgicas son reguladas por NGF tanto en su crecimiento como en su diferenciación, por lo que este tratamiento crónico debería haber potenciado también a estas fibras y de esta forma los niveles de ACh, hecho que no ocurrió. Por el contrario, solo la vía nerviosa simpática extrínseca se vio potenciada, favoreciendo la hiperinervación ovárica por fibras noradrenérgicas, generando un desbalance en la relación de las vías simpática/parasimpática.

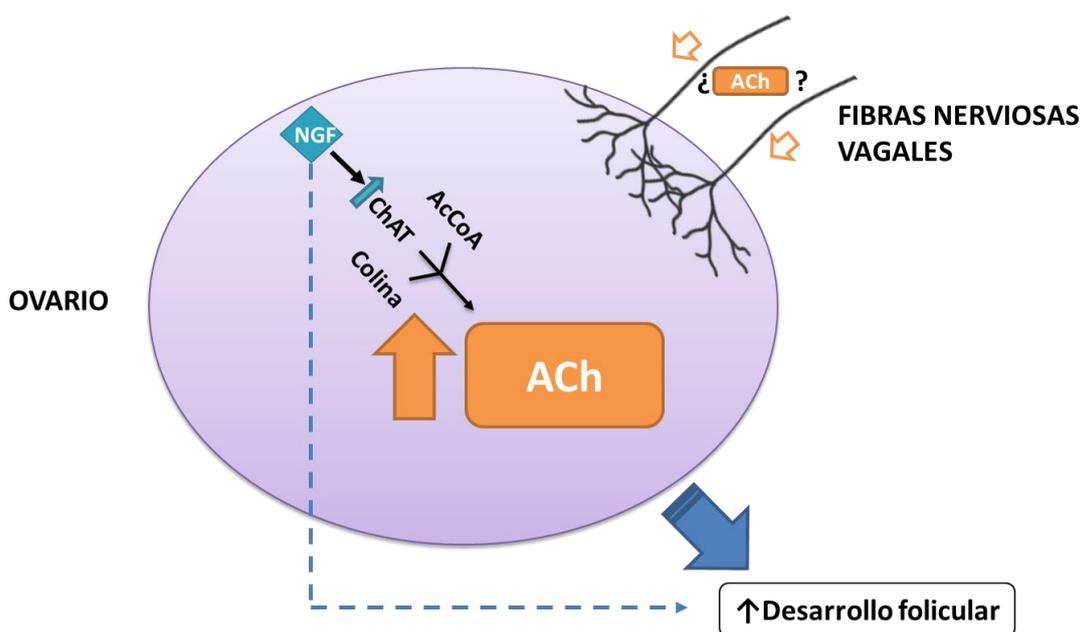


Figura 20: ACh se produce principalmente dentro del ovario y su producción es estimulada por NGF vía ChAT.

Finalmente, estos resultados también plantean la posibilidad de re-explorar los conocimientos que se tienen de NGF dentro del ovario. Y es que sus efectos sobre el desarrollo folicular que se han descrito hasta ahora podrían ser ejercidos directamente o indirectamente, ya que ACh también promueve el desarrollo folicular, principalmente en la fase preantral y el proceso ovulatorio. Por lo tanto, se abre la posibilidad de una mejor comprensión de los procesos que ocurren a nivel celular y que regularían la maquinaria intraovárica durante el crecimiento y diferenciación de los folículos (Figura 20).

6. CONCLUSIONES

Nuestros resultados indican que ACh es un factor clave en el desarrollo folicular, promoviendo la vía folicular sana sobre la vía atrésica o quística. El más importante hallazgo de este trabajo es que NGF estimula el ARNm de ChAT y VACHT ovárica y, probablemente, la producción de ACh. *In vivo*, encontramos que NGF indujo principalmente la activación de la vía simpática y un aumento en la ACHE, específicamente de la isoforma de 55 kDa, resultando en un desbalance en el sistema colinérgico y desarrollo folicular aberrante. En general, pareciera que NGF es un factor clave en la homeostasis para mantener el control del sistema autónomo dual, balanceando la salida de los sistemas simpáticos y colinérgicos para regular la función ovárica. Estos resultados abren la posibilidad de controlar farmacológicamente la actividad simpática y colinérgica mediante la administración dirigida hacia las células de granulosa y de esa forma regular el desarrollo folicular ovárico en la rata. Dado que estos mismos receptores colinérgicos muscarínicos se han descrito en células granulosas de ovario humano, la validación de este mecanismo propuesto en la tesis -- al igual como se ha validado para el sistema noradrenérgico ovárico (Lansdown and Rees, 2012) -- justifica un estudio similar en humanos.

7. REFERENCIAS

1. Aguado, L.I., Petrovic, S.L., Ojeda, S.R., 1982. Ovarian B-Adrenergic Receptors during the Onset of Puberty: Characterization, Distribution, and Coupling to Steroidogenic Responses. *Endocrinology* 110, 9.
2. Al-Zi'abi, M.O., Bowolaksono, A., Okuda, K., 2009. Survival role of locally produced acetylcholine in the bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 80, 823-832.
3. Araya, C., 2020. Efecto de la activación de los receptores muscarínicos sobre el desarrollo folicular de ratas tratadas con carbacol, Facultad de Farmacia, Escuela de Química y Farmacia, Universidad de Valparaíso.
4. Auld, D.S., Mennicken, F., Quirion, R., 2001. Nerve growth factor rapidly induces prolonged acetylcholine release from cultured basal forebrain neurons: differentiation between neuromodulatory and neurotrophic influences. *J Neurosci* 21, 3375-3382.
5. AVMA, 2020. American Veterinary Medical Association Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition.
6. Barrett, G.L., 2000. The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol* 61, 205-229.
7. Barria, A., Leyton, V., Ojeda, S.R., Lara, H., 1993. Ovarian Steroidal Response to Gonadotropins and B-Adrenergic Stimulation Is Enhanced in Polycystic Ovary Syndrome: Role of Sympathetic Innervation. *Endocrinology* 133, 8.
8. Bernuci, M.P., Leite, C.M., Barros, P., Kalil, B., Leoni, G.B., Del Bianco-Borges, B., Franci, C.R., Szawka, R.E., Lara, H.E., Anselmo-Franci, J.A., 2013. Transitory activation of the central and ovarian norepinephrine systems during cold stress-induced polycystic ovary in rats. *J Neuroendocrinol* 25, 23-33.
9. Blohberger, J., Kunz, L., Einwang, D., Berg, U., Berg, D., Ojeda, S.R., Dissen, G.A., Frohlich, T., Arnold, G.J., Soreq, H., Lara, H., Mayerhofer, A., 2015. Readthrough acetylcholinesterase (AChE-R) and regulated necrosis: pharmacological targets for the regulation of ovarian functions? *Cell Death Dis* 6, e1685.
10. Brawer, J.R., Munoz, M., Farookhi, R., 1986. Development of the polycystic ovarian condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat. *Biol Reprod* 35, 647-655.
11. Burden, H.W.L., I.E., 1978. Experimental Studies on the Acetylcholinesterase-positive Nerves in the Ovary of the Rat. *Anat Rec*, 9.
12. Chan, R.Y., Adatia, F.A., Krupa, A.M., Jasmin, B.J., 1998. Increased expression of acetylcholinesterase T and R transcripts during hematopoietic differentiation is accompanied by parallel elevations in the levels of their respective molecular forms. *J Biol Chem* 273, 9727-9733.
13. Chen, C., Shen, L., Cao, S., Li, X., Xuan, W., Zhang, J., Huang, X., Bin, J., Xu, D., Li, G., Kitakaze, M., Liao, Y., 2014. Cytosolic CARP promotes angiotensin II- or pressure overload-induced cardiomyocyte hypertrophy through calcineurin accumulation. *PLoS One* 9, e104040.
14. Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.
15. Cordon-Cardo, C., Tapley, P., Jing, S.Q., Nanduri, V., O'Rourke, E., Lamballe, F., Kovary, K., Klein, R., Jones, K.R., Reichardt, L.F., et al., 1991. The trk tyrosine protein kinase mediates the mitogenic properties of nerve growth factor and neurotrophin-3. *Cell* 66, 173-183.
16. Cruz, M.E., Flores, A., Alvarado, B.E., Hernández, C.G., Zárate, A., Chavira, R., Cárdenas, M., Arrieta-Cruz, I., Gutiérrez-Juárez, R., 2015. Ovulation requires the activation on proestrus of M₁ muscarinic receptors in the left ovary. *Endocrine* 49, 809-819.
17. Cruz, M.E., Flores, A., Palafox, M.T., Melendez, G., Rodríguez, J.O., Chavira, R., Dominguez, R., 2006. The role of the muscarinic system in regulating estradiol

- secretion varies during the estrous cycle: the hemiovariectomized rat model. *Reprod Biol Endocrinol* 4, 43.
18. Cushing, P., Bhalla, R., Johnson, A.M., Rushlow, W.J., Meakin, S.O., Belliveau, D.J., 2005. Nerve growth factor increases connexin43 phosphorylation and gap junctional intercellular communication. *J Neurosci Res* 82, 788-801.
 19. Del Campo, M., Lagos, N., Lara, H., 2020. In vivo blockade of ovarian sympathetic activity by Neosaxitoxin prevents polycystic ovary in rats. *J Endocrinol*.
 20. Del Campo, M., Piquer, B., Witherington, J., Sridhar, A., Lara, H.E., 2019. Effect of Superior Ovarian Nerve and Plexus Nerve Sympathetic Denervation on Ovarian-Derived Infertility Provoked by Estradiol Exposure to Rats. *Front Physiol* 10, 349.
 21. Dissen, G., HE, L., V, L., A, P., DF, H., ME, C., A, M.-S., SR, O., 2000. Intraovarian excess of nerve growth factor increases androgen secretion and disrupts estrous cyclicity in the rat. *Endocrinology* 141, 10.
 22. Dissen, G.A., Garcia-Rudaz, C., Paredes, A., Mayer, C., Mayerhofer, A., Ojeda, S.R., 2009. Excessive ovarian production of nerve growth factor facilitates development of cystic ovarian morphology in mice and is a feature of polycystic ovarian syndrome in humans. *Endocrinology* 150, 2906-2914.
 23. Dissen, G.A., Hill, D.F., Costa, M.E., Les Dees, C.W., Lara, H.E., Ojeda, S.R., 1996. A role for trkA nerve growth factor receptors in mammalian ovulation. *Endocrinology* 137, 198-209.
 24. Dissen, G.A., Hill, D.F., Costa, M.E., Ma, Y.J., Ojeda, S.R., 1991. Nerve growth factor receptors in the peripubertal rat ovary. *Mol Endocrinol* 5, 1642-1650.
 25. Dissen, G.A., Romero, C., Hirshfield, A.N., Ojeda, S.R., 2001. Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. *Endocrinology* 142, 2078-2086.
 26. Dominguez, R., Riboni, L., Zipitría, D., Revilla, R., 1982. Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the oestrous cycle related to ovulation in the rat? 95, 6.
 27. Dorfman, M., Arancibia, S., Fiedler, J.L., Lara, H.E., 2003. Chronic intermittent cold stress activates ovarian sympathetic nerves and modifies ovarian follicular development in the rat. *Biol Reprod* 68, 2038-2043.
 28. Du, Y., Bagnjuk, K., Lawson, M.S., Xu, J., Mayerhofer, A., 2018. Acetylcholine and necroptosis are players in follicular development in primates. *Sci Rep* 8, 6166.
 29. Fernandois, D., Lara, H.E., Paredes, A.H., 2012. Blocking of β -adrenergic receptors during the subfertile period inhibits spontaneous ovarian cyst formation in rats. *Horm Metab Res* 44, 682-687.
 30. Fritz, S., Föhr, K.J., Boddien, S., Berg, U., Brucker, C., Mayerhofer, A., 1999. Functional and molecular characterization of a muscarinic receptor type and evidence for expression of choline-acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter in human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 1744-1750.
 31. Fritz, S., Kunz, L., Dimitrijevic, N., Grünert, R., Heiss, C., Mayerhofer, A., 2002. Muscarinic receptors in human luteinized granulosa cells: activation blocks gap junctions and induces the transcription factor early growth response factor-1. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 1362-1367.
 32. Fritz, S., Wessler, I., Breitling, R., Rossmanith, W., Ojeda, S.R., Dissen, G.A., Amsterdam, A., Mayerhofer, A., 2001. Expression of Muscarinic Receptor Types in the Primate Ovary and Evidence for Nonneuronal Acetylcholine Synthesis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86, 6.
 33. Fu, X., Zheng, Q., Zhang, N., Ding, M., Pan, X., Wang, W., Chen, H., 2020. CUMS Promotes the Development of Premature Ovarian Insufficiency Mediated by Nerve Growth Factor and Its Receptor in Rats. *Biomed Res Int* 2020, 1946853.

34. Gähwiler, B.H., Rietschin, L., Knöpfel, T., Enz, A., 1990. Continuous presence of nerve growth factor is required for maintenance of cholinergic septal neurons in organotypic slice cultures. *Neuroscience* 36, 27-31.
35. García-Ayllón, M.S., Millán, C., Serra-Basante, C., Bataller, R., Sáez-Valero, J., 2012. Readthrough acetylcholinesterase is increased in human liver cirrhosis. *PLoS One* 7, e44598.
36. Garrido, M.P., Fernandois, D., Venegas, M., Paredes, A.H., 2018. Effects of sympathectomy on ovarian follicular development and steroid secretion. *Reproduction* 155, 173-181.
37. Gerendai, I., Kocsis, K., Halász, B., 2002. Supraspinal connections of the ovary: structural and functional aspects. *Microsc Res Tech* 59, 474-483.
38. Gerendai, I., Tóth, I.E., Boldogkői, Z., Medvecky, I., Halász, B., 2000. CNS structures presumably involved in vagal control of ovarian function. *Journal of the Autonomic Nervous System* 1-2, 6.
39. Gilboa-Geffen, A., Lacoste, P.P., Soreq, L., Cizeron-Clairac, G., Le Panse, R., Truffault, F., Shaked, I., Soreq, H., Berrih-Aknin, S., 2007. The thymic theme of acetylcholinesterase splice variants in myasthenia gravis. *Blood* 109, 4383-4391.
40. Granot, I.D., N., 1997. Developmental Expression and Regulation of the Gap Junction Protein and Transcript in Rat Ovaries. *Molecular Reproduction And Development*, 9.
41. Grisar, D., Deutsch, V., Shapira, M., Pick, M., Sternfeld, M., Melamed-Book, N., Kaufer, D., Galyam, N., Gait, M.J., Owen, D., Lessing, J.B., Eldor, A., Soreq, H., 2001. ARP, a peptide derived from the stress-associated acetylcholinesterase variant, has hematopoietic growth promoting activities. *Mol Med* 7, 93-105.
42. Hirshfield, A.N., Midgley, A.R., Jr., 1978. Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biol Reprod* 19, 597-605.
43. Hubscher, C.H., Brooks, D.L., Johnson, J.R., 2005. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotech Histochem* 80, 79-87.
44. Imperato, A., Puglisi-Allegra, S., Casolini, P., Angelucci, L., 1991. Changes in brain dopamine and acetylcholine release during and following stress are independent of the pituitary-adrenocortical axis. *Brain Res* 538, 111-117.
45. Julio-Pieper, M., Lara, H.E., Bravo, J.A., Romero, C., 2006. Effects of nerve growth factor (NGF) on blood vessels area and expression of the angiogenic factors VEGF and TGFbeta1 in the rat ovary. *Reprod Biol Endocrinol* 4, 57.
46. Kaufer, D., Friedman, A., Seidman, S., Soreq, H., 1998. Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature* 393, 373-377.
47. Kurzen, H., Wessler, I., Kirkpatrick, C.J., Kawashima, K., Grando, S.A., 2007. The non-neuronal cholinergic system of human skin. *Horm Metab Res* 39, 125-135.
48. Lansdown, A., Rees, D.A., 2012. The sympathetic nervous system in polycystic ovary syndrome: a novel therapeutic target? *Clin Endocrinol (Oxf)* 77, 791-801.
49. Lapchak, P.A., Hefti, F., 1991. Effect of recombinant human nerve growth factor on presynaptic cholinergic function in rat hippocampal slices following partial septohippocampal lesions: measures of [3H]acetylcholine synthesis, [3H]acetylcholine release and choline acetyltransferase activity. *Neuroscience* 42, 639-649.
50. Lara, H., Hill, D., Katz, K., Ojeda, S.R., 1990a. The Gene Encoding Nerve Growth Factor Is Expressed in the Immature Rat Ovary: Effect of Denervation and Hormonal Treatment. 126, 7.
51. Lara, H., McDonald, J.K., Ahmed, C.E., Ojeda, S.R., 1990b. Guanethidine-Mediated Destruction of Ovarian Sympathetic Nerves Disrupts Ovarian Development and Function in Rats. *Endocrinology* 127, 11.
52. Lara, H.E., Dissen, G.A., Leyton, V., Paredes, A., Fuenzalida, H., Fiedler, J.L., Ojeda, S.R., 2000. An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity

- receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology* 141, 1059-1072.
53. Lara, H.E., Dorfman, M., Venegas, M., Luza, S.M., Luna, S.L., Mayerhofer, A., Guimaraes, M.A., Rosa E Silva, A.A., Ramírez, V.D., 2002. Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary during a normal estrous cycle and in polycystic ovary syndrome: Studies on norepinephrine release. *Microsc Res Tech* 59, 495-502.
 54. Lara, H.E., Ferruz, J.L., Luza, S., Bustamante, D.A., Borges, Y., Ojeda, S.R., 1993. Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 133, 2690-2695.
 55. Lara, H.E., McDonald, J.K., Ojeda, S.R., 1990c. Involvement of nerve growth factor in female sexual development. *Endocrinology* 126, 364-375.
 56. Lawrence, I.E., Burden, H.W., 1980. The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *Anat Rec* 196, 51-59.
 57. Leung, P., Adashi, E., 2004. *The Ovary*, Second edition ed. Elsevier Inc Oxford, Reino Unido.
 58. Linares, R., Acuna, X.N., Rosas, G., Vieyra, E., Ramirez, D.A., Chaparro, A., Espinoza, J.A., Dominguez, R., Morales-Ledesma, L., 2021. Participation of the Cholinergic System in the Development of Polycystic Ovary Syndrome. *Molecules* 26.
 59. Lips, K.S., Lührmann, A., Tschernig, T., Stoeger, T., Alessandrini, F., Grau, V., Haberberger, R.V., Koepsell, H., Pabst, R., Kummer, W., 2007. Down-regulation of the non-neuronal acetylcholine synthesis and release machinery in acute allergic airway inflammation of rat and mouse. *Life Sci* 80, 2263-2269.
 60. Mallet, J., Houhou, L., Pajak, F., Oda, Y., Cervini, R., Bejanin, S., Berrard, S., 1998. The cholinergic locus: ChAT and VACHT genes. *J Physiol Paris* 92, 145-147.
 61. Manning, P., Powers, C., Schmidt, R., Johnson, E.M., 1983. Guanethidine-induced destruction of peripheral sympathetic neurons occurs by an immune-mediated mechanism. *The Journal of Neuroscience* 3, 11.
 62. Manti, M., Pui, H.P., Edstrom, S., Risal, S., Lu, H., Lindgren, E., Ohlsson, C., Jerlhag, E., Benrick, A., Deng, Q., Stener-Victorin, E., 2020. Excess of ovarian nerve growth factor impairs embryonic development and causes reproductive and metabolic dysfunction in adult female mice. *FASEB J*.
 63. Mayerhofer, A., Kunz, L., Krieger, A., Proskocil, B., Spindel, E., Amsterdam, A., Dissen, G.A., Ojeda, S.R., Wessler, I., 2006. FSH regulates acetylcholine production by ovarian granulosa cells. *Reprod Biol Endocrinol* 4, 37.
 64. Mayerhofer, A.D., G. ; Costa, M. ; Ojeda, S., 1997. A Role for Neurotransmitters in Early Follicular Development: Induction of Functional Follicle-Stimulating Hormone Receptors in Newly Formed Follicles of the Rat Ovary. *Endocrinology* 138, 10.
 65. Meinel, S., Blohberger, J., Berg, D., Berg, U., Dissen, G.A., Ojeda, S.R., Mayerhofer, A., 2015. Pro-nerve growth factor in the ovary and human granulosa cells. *Horm Mol Biol Clin Investig* 24, 91-99.
 66. Mekker, R.B., Swanson, D.J., Hayward, J., 1988. Local Synaptic Organization of Cholinergic Neurons in the Basolateral Hypothalamus. *The Journal of Comparative Neurology* 276, 12.
 67. Montenegro, M.F., Cabezas-Herrera, J., Campoy, F.J., Muñoz-Delgado, E., Vidal, C.J., 2017. Lipid rafts of mouse liver contain nonextended and extended acetylcholinesterase variants along with M3 muscarinic receptors. *FASEB J* 31, 544-555.
 68. Ojeda, S., Lara, H.E., 1989. Role of the Sympathetic Nervous System in the regulation of Ovarian Function, *The menstrual cycle and its disorders*, pp. 26-32.
 69. Oosawa, H., Fujii, T., Kawashima, K., 1999. Nerve growth factor increases the synthesis and release of acetylcholine and the expression of vesicular acetylcholine transporter in primary cultured rat embryonic septal cells. *J Neurosci Res* 57, 381-387.

70. Paccola, C.C., Resende, C.G., Stumpp, T., Miraglia, S.M., Cipriano, I., 2013. The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. *10*, 7.
71. Paredes, A., Gálvez, A., Leyton, V., Aravena, G., Fiedler, J.L., Bustamante, D., Lara, H.E., 1998. Stress promotes development of ovarian cysts in rats: the possible role of sympathetic nerve activation. *Endocrine* 8, 309-315.
72. Pongrac, J.L.R., R.J., 1998. NGF-induction of the expression of ChAT mRNA in PC12 cells and primary cultures of embryonic rat basal forebrain. *62*, 10.
73. Rang, H.P., Ritter, J.M., Flower, R.J., Hernderson, G., 2016. *Pharmacology*, Octava edición ed. Elsevier, China.
74. Richards, J.S., Hedin, L., Caston, L., 1986. Differentiation of rat ovarian thecal cells: evidence for functional luteinization. *Endocrinology* 118, 1660-1668.
75. Ricu, M., Paredes, A., Greiner, M., Ojeda, S.R., Lara, H.E., 2008. Functional development of the ovarian noradrenergic innervation. *Endocrinology* 149, 50-56.
76. Riquelme, R., 2019. La administración intraovárica de Huperzina-A revierte las alteraciones en la función ovárica inducidas por estrés en ratas adultas, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, p. 83.
77. Riquelme, R., Ruz, F., Mayerhofer, A., Lara, H.E., 2019. Role of ovarian sympathetic nerves and cholinergic local system during cold stress. *J Endocrinol* 242, 115-124.
78. Riquelme, R., Ruz, F., Mayerhofer, A., Lara, H.E., 2021. Huperzine-A administration recovers rat ovary function after sympathetic stress. *J Neuroendocrinol* 33, e12914.
79. Romero, C., Paredes, A., Dissen, G.A., Ojeda, S.R., 2002. Nerve growth factor induces the expression of functional FSH receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* 143, 1485-1494.
80. Silveyra, M.X., Evin, G., Montenegro, M.F., Vidal, C.J., Martínez, S., Culvenor, J.G., Sáez-Valero, J., 2008. Presenilin 1 interacts with acetylcholinesterase and alters its enzymatic activity and glycosylation. *Mol Cell Biol* 28, 2908-2919.
81. Singh, M., Sétáló, G.J., Guan, X., Warren, M., Toran-Allerand, C.D., 1999. Estrogen-Induced Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase in Cerebral Cortical Explants: Convergence of Estrogen and Neurotrophin Signaling Pathways. *The Journal of Neuroscience* 19, 10.
82. Soret, R., Chevalier, J., De Coppet, P., Poupeau, G., Derkinderen, P., Segain, J.P., Neunlist, M., 2010. Short-chain fatty acids regulate the enteric neurons and control gastrointestinal motility in rats. *Gastroenterology* 138, 1772-1782.
83. Sotomayor-Zarate, R., Dorfman, M., Paredes, A., Lara, H.E., 2008. Neonatal exposure to estradiol valerate programs ovarian sympathetic innervation and follicular development in the adult rat. *Biol Reprod* 78, 673-680.
84. Squicciarini, V., Riquelme, R., Wilsterman, K., Bentley, G.E., Lara, H.E., 2018. Role of RFRP-3 in the development of cold stress-induced polycystic ovary phenotype in rats. *J Endocrinol* 239, 81-91.
85. Takei, Y., Laskey, R., 2008. Interpreting crosstalk between TNF-alpha and NGF: potential implications for disease. *Trends Mol Med* 14, 381-388.
86. Toran-Allerand, C.D.S., M., Sétáló, G.J., 1999. Novel Mechanisms of Estrogen Action in the Brain: New Players in an Old Story. *Frontiers in Neuroendocrinology* 20, 25.
87. Urra, J., Blohberger, J., Tiszavari, M., Mayerhofer, A., Lara, H.E., 2016. In vivo blockade of acetylcholinesterase increases intraovarian acetylcholine and enhances follicular development and fertility in the rat. *Sci Rep* 6, 30129.
88. Wessler, I., Kilbinger, H., Bittinger, F., Unger, R., Kirkpatrick, C.J., 2003. The non-neuronal cholinergic system in humans: Expression, function and pathophysiology. *Life Sciences* 72, 2055-2061.