

# UNIVERSIDAD DE CHILE

## FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***Caracterización del efecto de la acetilcolina sobre el desarrollo folicular de ovario de rata. Origen de la inervación colinérgica, acción sobre receptores y de la necroptosis en la atresia folicular asociada con la función ovárica***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de **Doctora en Farmacología** por:

**Fernanda Camila Cuevas Contreras**

Director de tesis: Dr. Hernán Lara Peñaloza

Junio 2022

**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 la candidata:

**FERNANDA CAMILA CUEVAS CONTRERAS**

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:**

**Dr. Guillermo Díaz Araya (Presidente)**

\_\_\_\_\_

**Dra. María Margarita Vega Blanco**

\_\_\_\_\_

**Dra. Alejandra Álvarez Rojas**

\_\_\_\_\_

**Dr. Jorge Fuentealba Arcos**

\_\_\_\_\_

A mis padres María Elena, Juan Carlos,  
y a mis sobrinas Constanza y Julieta

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría agradecer a todas las personas que desde un inicio apoyaron y me ayudaron a realizar mis estudios de postgrado, como aquellos que fui conociendo en el camino y se convirtieron en parte importante de este proceso.

Agradezco a mi tutor el Profesor Hernán Lara por recibirme en su laboratorio, tenerme una paciencia excepcional, enseñarme, ayudarme en mi formación, alentarme cuando todo iba mal y animarme a nuevos desafíos, como también el compartir sus historias de Copito, Toby, Tenazas y Naranjin que alegraban los almuerzos y generaban un ambiente cálido y familiar en el laboratorio en donde era motivante trabajar. También agradezco al Profesor Paredes, por ayudarme en seminarios y en el trabajo de laboratorio, como también en ser parte del grato ambiente que siempre existió en el Laboratorio de Neurobioquímica. A mis compañeros de Laboratorio: Agustín, Valentina, Raúl, Miguel, Profe Monika, quienes también fueron parte del desarrollo de mi tesis. En especial agradecer a Coni y Sari, por ser no solo excelentes compañeras de laboratorio sino ser excelentes amigas y personas.

Agradezco a mis amigos de siempre: Rosi, Carlos, Paulilla, Aguayo, Ange, Pahua, Nati, Carito, Lesly, Cris, Juan, Vale, y a mis amigos que hice en el camino: Coni, Sara y Jenaro. A mis compañeros del programa: Agustín Carlos, Andrea y Peter con los que compartimos el estrés de los cursos y con quienes viví juntos el primer año del doctorado. En particular al Agus (Gazapito), con quien además compartí laboratorio y me ayudó durante el proceso de esta tesis.

Finalmente, agradezco a mi familia: a mi papá Juan Carlos, a mis hermanos, tías y en especial a mi mamá, María Elena, quien me acompañó y apoyo en todo el proceso previo al ingreso de mi doctorado, y quien lamentablemente no pudo acompañarme durante este proceso.

## **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°21161032– Becaria Fernanda Camila Cuevas Contreras.

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

**2019 Cuevas, F.**, Lara, H.E. “The effect of the allosteric inhibitor of ripk1 (nec-1) on ovary function: importance of necroptosis in follicular development”. XXX Annual Congress of Pharmacology of Chile (SOFARCHI), Concepción, Chile.

**2019** Peña S., Vargas C., Rubio M., **Cuevas F.**, and Paredes A.H. “Leukemia inhibitory factor, a new modulator of the ovary cholinergic system in adult rat” XXX Annual Congress of Pharmacology of Chile (SOFARCHI), Concepción, Chile.

**2018** Benitez A, **Cuevas F.**, Azócar A, Riquelme R, Lara HE. “Chronic cold stress produces an increment in acetylcholine levels and cholinesterase activity in rat ovary”. 18th WORLD CONGRESS OF BASIC AND CLINICAL PHARMACOLOGY (WCP). Desde 1 al 6 de julio, Kioto, Japon

**2017 Cuevas, F.**; Benítez, A.; Riquelme, R.; Lara, H. “Trophic functions of the acetylcholinesterase enzyme as a new pharmacological target”. XXXIX ANNUAL CONGRESS SOCIEDAD DE PHARMACOLOGÍA DE CHILE (SOFARCHI). Puerto Varas, Chile.

**2017** Benítez, A.; **Cuevas, F.**; Riquelme, R.; Lara, H. “Functional changes in acetylcholine levels and acetylcholinesterase activity in rat ovary by the effect of stress”. XXXIX ANNUAL CONGRESS SOCIEDAD DE FARMACOLOGÍA DE CHILE (SOFARCHI), Concon, Chile.

**2017** Benítez, Agustín (AB), **Cuevas, Fernanda (FC)**, Riquelme, Raúl (RR) and Lara, Hernan (HL) “Changes in cholinergic neuronal markers in the rat ovary after the chronic exposure to cold-stress” INTERNATIONAL WORKSHOP IN NEUROENDOCRINOLOGY (IWNE). Concon, Chile.

## **PUBLICACIONES**

Parte de los resultados de esta tesis han dado origen a un artículo científico publicado en la revista *Physiological Reports*:

"MUSCARINIC RECEPTORS IN THE RAT OVARY ARE INVOLVED IN FOLLICULAR DEVELOPMENT BUT NOT IN STEROID SECRETION"

Cuevas, Fernanda; Bastias, Daniela; Alanis, Constanza; Benitez, Agustin; Squicciarini, Valentina; Riquelme, Raul; Sessenhausen, Pia; Mayerhofer, Artur; Lara, Hernan

# ÍNDICE

	página
ÍNDICE DE FIGURAS .....	X
ABREVIACIONES .....	XII
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	3
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Función ovárica .....	6
1.2 Desarrollo folicular .....	6
1.3 Control de la función ovárica .....	9
1.4 Evidencias de un Sistema Colinérgico intrínseco en ovario .....	10
1.5 Efectos de la sobre-activación simpática en el modelo de estrés por frío .....	12
1.6 Atresia folicular .....	13
1.7 Tipos de muerte celular presente en ovario .....	16
1.8 Necroptosis .....	18
1.7 Inhibidores de la Necroptosis: Necrostatina-1 y Necrosulfonamida .....	19
1.10 Necroptosis en el ovario .....	20
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
2.1 Hipótesis .....	23
2.2 Objetivo general .....	23
2.3 Objetivos específicos .....	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Animales .....	24
3.2 Estudios de denervación .....	25
3.3 Secreción de esteroides ováricos <i>in vitro</i> .....	25
3.4 Protocolo de estrés .....	26
3.5 Administración intra-ovárica de NEC-1 y NSA .....	26
3.6 Estudios de administración de atropina in vivo .....	27
3.7 Determinación del ciclo estral .....	28
3.8 Determinación de los niveles proteicos de MLKL, RIPK3, M5, M3 y M1 .....	29
3.9 Análisis Morfológicos .....	30
3.10 Inmunohistoquímica para MLKL y BAX .....	30
3.11 Inmunohistoquímica de los receptores M1, M3 y M5 .....	31
3.12 Estudios PCR .....	31
3.13 Determinación de Noradrenalina (NE) y Acetilcolina (ACh) .....	32
3.14 Mediciones de hormonas esteroidales .....	33
3.15 Tamaño muestral .....	33
3.16 Análisis Estadísticos .....	33
4. RESULTADOS	
OBJETIVO 1	
1.1 Estudio de la inervación colinérgica ovárica .....	35
1.2 Distribución intra-ovárica de los receptores muscarínicos .....	36

1.3 Activación de los receptores y síntesis de esteroides .....	38
1.4 Efecto de la inhibición de los receptores en el desarrollo folicular .....	39
OBJETIVO 2	
2.1 Efecto del estrés en los receptores muscarínicos en ovario .....	40
2.2 Activación muscarínica sobre la secreción de esteroides en ovarios control y estrés .	41
2.3 Efecto del bloqueo de los receptores muscarínicos sobre el desarrollo folicular del ovario de ratas control y estrés .....	43
OBJETIVO 3	
3.1 Evaluación de los efectos a la exposición intrabursal crónica de NEC-1 en la función ovárica .....	44
3.2 Evaluación de los efectos a la exposición intrabursal crónica de NSA en la función ovárica .....	50
3.3 Efectos en marcadores moleculares de la necroptosis por el tratamiento con NEC-1 y NSA en ovario de ratas .....	55
3.4 Efectos del tratamiento por 4 semanas con NEC-1 más 4 semanas sin tratamiento ...	57
3.5 Efectos en la necroptosis en un modelo fisiopatológico de SOP por estrés simpático	62
5. DISCUSIÓN	
OBJETIVO 1	
1.1 Estudio de la inervación colinérgica ovárica .....	64
1.2 Distribución intra-ovárica de los receptores muscarínicos .....	65
1.3 Activación de los receptores y síntesis de esteroides .....	66
1.4 Efecto de la inhibición de los receptores en el desarrollo folicular .....	67
OBJETIVO 2	
2.1 Efecto del estrés en los receptores muscarínicos en ovario .....	68
2.2 Activación muscarínica sobre la secreción de esteroides en ovarios control y estrés .	68
2.3 Efecto del bloqueo de los receptores muscarínicos sobre el desarrollo folicular del ovario de ratas control y estrés .....	68
OBJETIVO 3	
3.1 Evaluación de los efectos a la exposición intrabursal crónica de NEC-1 en la función ovárica .....	70
3.2 Evaluación de los efectos a la exposición intrabursal crónica de NSA en la función ovárica .....	72
3.3 Efectos en marcadores moleculares de la necroptosis por el tratamiento con NEC-1 y NSA en ovario de ratas .....	73
3.4 Efectos del tratamiento por 4 semanas con NEC-1 más 4 semanas sin tratamiento ...	75
3.5 Efectos en la necroptosis en un modelo fisiopatológico de SOP por estrés simpático	75
6. CONCLUSIONES .....	78
7. BIBLIOGRAFÍA .....	79

## ÍNDICE DE FIGURAS

	pagina
Figura 1: Hitos del desarrollo folicular durante la vida fetal y neonatal en humanos y roedores .....	8
Figura 2: Esquema del desarrollo folicular en ratas .....	9
Figura 3: Clasificación de folículos atrésicos .....	14
Figura 4: Atresia folículos pre-antrales .....	16
Figura 5: Esquema resumen .....	22
Figura 6: Esquema bomba mini-osmótica .....	27
Figura 7: Ciclicidad estral .....	29
Figura 8: El efecto de la denervación quirúrgica del nervio ovárico superior (SONX) o del plexo ovárico (PNX) sobre la concentración de noradrenalina (NA) o acetilcolina (ACh) en el ovario .....	35
Figura 9: Detección inmunohistoquímica de receptores M1 y M3 en ovario de rata .....	37
Figura 10: Detección inmunohistoquímica del receptor M5 en el ovario de rata .....	38
Figura 11: Secreción ex vivo de hormonas esteroidales .....	39
Figura 12: Administración intra-ovárica in vivo de atropina .....	39
Figura 13: Niveles de mensajero y proteicos de los receptores muscarínicos durante estrés .....	41
Figura 14: : Mediciones de esteroides en medios .....	42
Figura 15: Análisis morfométrico de los ovarios después de la exposición intrabursal in vivo con atropina 100 µM durante 28 días .....	43
Figura 16: Efectos generales de la administración de NEC-1 .....	45
Figura 17: Efecto de NEC-1 sobre el tamaño de los folículos antrales sanos, cuerpos luteos y quistes en ovario de rata .....	46
Figura 18: Efecto de NEC-1 sobre la morfología ovárica de rata .....	47
Figura 19: Efecto de NEC-1 sobre el tamaño de los folículos atrésicos y los folículos de tipo III en ovario de rata .....	48
Figura 20: Corte central de ovarios .....	49
Figura 21: Niveles Hormonales en plasma finalizado el tratamiento de NEC-1 .....	49
Figura 22: Efectos generales de la administración de NSA .....	51
Figura 23: Efecto de NSA sobre la morfología ovárica de rata .....	52
Figura 24: Efecto de NSA sobre el tamaño de los folículos antrales sanos, cuerpos lúteos y quistes en ovario de rata .....	53
Figura 25: Efecto de NSA sobre el tamaño de los folículos atrésicos y los folículos de tipo III en ovario de rata .....	54
Figura 26: Niveles Hormonales en plasma finalizado el tratamiento de NEC-1 .....	55
Figura 27: Distribución de Bax y Mkl1 en ovario de rata .....	56

Figura 28: Cambios en los marcadores de necroptosis después del tratamiento con NEC-1 en ovarios de rata .....	57
Figura 29: Efectos generales de la administración de NEC-1 .....	58
Figura 30: Efecto de NEC-1 sobre la morfología ovárica de rata posterior a 28 días sin tratamiento .....	59
Figura 31: Efecto de NEC-1 por 28 días y 28 días sin tratamiento sobre el tamaño de los folículos antrales sanos, cuerpos lúteos y quistes en ovario de rata .....	60
Figura 32: Efecto de NEC-1 sobre el tamaño de los folículos atrésicos y los folículos de tipo III en ovario de rata .....	61
Figura 33: Niveles Hormonales en plasma finalizado el tratamiento de NEC-1 .....	62
Figura 34: Marcadores de necroptosis en el modelo SOP en ovarios de rata .....	63
Figura 35. Resumen de principales hallazgos .....	77

## ÍNDICE DE ABREVIACIONES

3 $\beta$ -HSD	3 beta hidroxisteroide deshidrogenasa
$\alpha$ SMA	Smooth muscle actin
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
ARNm	ARN mensajero
BAX	proteína X asociada a Bcl2
BKCa	canales de potasio operados por calcio
Cch	carbacol
ChAT	Colina Acetiltransferasa
CL	Cuerpo Lúteo
D	Diestro 1 y 2
GC	Células de la Granulosa
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
E	Estro
E2	Estradiol
FSH	Hormona Folículo-Estimulante
GD	Guanetidina
IHQ	Inmunohistoquímica
i.m. / i.p.	Intramuscular/Intraperitoneal
KO	Knockout
LC3	proteína 3 de cadena ligera asociada a microtúbulos
LH	Hormona Luteinizante
M1/M3/M5	Receptor Muscarínico subtipo-1/ 3 / 5
MLKL	Mixed Lineage Kinasedomain-Like
MLKL-P	MLKL fosforilada
NA	Noradrenalina
NEC-1	Necrostatina 1
NO	Óxido nítrico
NSA	Necrosulfonamida
NV	Nervio Vago
P4	Progesterona
PCOS	Síndrome del Ovario Poliquístico
PsK	Dominio pseudoquinasa
P450scc	Side-chain cleavage
Ser	Serina
SON	Nervio Ovárico Superior
SQSTM1/P62	Sequestosome 1
P	Proestro
PN	Nervios del Plexo Ovárico
RIPK 1/3	proteínas quinasas que interactúan con el receptor 1 y 3
PreABS	Preadsorbidos

ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-qPCR	Transcripción Reversa-PCR en Tiempo Real
SONX	Deleción quirúrgica del NOS
T	Testosterona
Thr	Treonina
TLR4 / TLR3	Receptores tipo toll 4 y 3
TMB	Tetrametilbencidina
TNFR	Receptores del factor de necrosis tumoral
VAcHT	Transportador Vesicular de ACh
WB	Western Blot

## Resumen

Es conocido que la secreción de esteroides y el desarrollo folicular del ovario de mamíferos es controlada por el hipotálamo a través de la secreción de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), la que por vía portal, estimula la secreción de gonadotrofinas. Durante la última década, se ha obtenido evidencia experimental de que el sistema nervioso autonómico representa la regulación fina del funcionamiento ovárico. El sistema nervioso simpático a través de la norepinefrina (NE), es capaz de regular la secreción de esteroides y del desarrollo folicular. Aunque se sabe que el ovario recibe inervación parasimpática a través del nervio vago, solo existen evidencias aisladas sobre la función de la acetilcolina (ACh) en la secreción de esteroides y en el desarrollo folicular del ovario. Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que la administración intra-bursal de Huperzina A (bloqueador de la acetilcolinesterasa) durante 28 días, aumenta los niveles de ACh intra-ováricos favoreciendo el desarrollo folicular, demostrado por el aumento del número de folículos antrales sanos, cuerpos lúteos y una mayor fertilidad, pero aún no se sabe si la ACh regula el desarrollo folicular o modifica la atresia folicular ya que del balance de ambos procesos depende el número de folículos sanos que ovulan. El objetivo de este trabajo fue caracterizar bioquímica y funcionalmente el sistema colinérgico intra-ovárico y para ello planteamos la siguiente hipótesis: “La acetilcolina intra-ovárica estimula el desarrollo folicular de rata, regulando los procesos de atresia a través de necroptosis y regulando solo indirectamente la síntesis de esteroides foliculares”. Para ello, a.- estudiamos el origen de ACh intra-ovárica, b.- la distribución celular de los receptores muscarínicos (MR) del subtipo M1, M3 y M5, y c.- la participación de los MR en la esteroidogénesis del ovario. También estudiamos su participación en el desarrollo folicular ovárico de animales en condiciones normales y expuestos a condiciones de estrés en presencia o ausencia del antagonista muscarínico, atropina. Con respecto al primer punto encontramos que la denervación disminuyó la NE ovárica, pero no así la ACh ovárica, evidenciando una fuente local no neuronal de ACh. Con respecto al punto b.- los M1 están ubicados en células de la granulosa (GC) y especialmente en los

folículos pre-antrales y antrales grandes. Los M5 están asociados con el sistema vascular ovárico y solo se encontraron rastros de M3. Finalmente, en el punto c.- la incubación de ovarios ex vivo mostró que el agonista de MR, Carbacol no modificó ni la producción de esteroides ni tampoco la expresión de las enzimas de su biosíntesis. Los estudios in vivo demostraron que el bloqueo de la acción colinérgica por la administración intra-bursal del antagonista atropina, in vivo durante 28 días, aumentó la atresia de los folículos secundarios. Los resultados apoyan la existencia de un sistema colinérgico intra-ovárico en el ovario de rata, localizado principalmente en las GC foliculares, que no está involucrado en la producción de esteroides sino más bien ejerce funciones tróficas como en la regulación de la atresia folicular. Dado que uno de los factores más afectados en el desarrollo folicular no solo fue la estimulación del desarrollo folicular, sino que importantemente la atresia folicular -- y debido a discrepancias en la literatura sobre la predominancia en los procesos de atresia folicular por apoptosis o necroptosis -- estudiamos la participación de la necroptosis como un mecanismo importante en la atresia folicular y sus modificaciones en procesos patológicos. La exposición crónica del ovario a la acción directa de inhibidores farmacológicos del paso clave en la cascada necroptótica: a. necrostatina-1 (NEC-1) y b. necrosulfonamida (NSA), para inhibir la necroptosis, produjo cambios importantes en el desarrollo folicular. La administración de NEC-1 durante 28 días, aumentó el número de folículos atrésicos pequeños y de estructuras pre-quísticas (folículos tipo III). Además, se observaron niveles elevados del marcador necroptótico la proteína Mlkl (mixed lineage kinase domain-like protein); sugiriendo que la inhibición de la cascada necroptótica a nivel de RPK1 sería uno de los mecanismos importantes que participan en la desaparición de los folículos atrésicos y en la transición de folículos tipo III a quistes. El tratamiento con NSA sin embargo, no cambió la morfología ovárica de los animales tratados, lo que sugiere un papel menor en la inhibición de la necroptosis a nivel de MLKL . El estrés simpático (caracterizado por un aumento de la atresia y el desarrollo de un fenotipo poli-quístico) aumentó la proteína Mlkl al igual que lo encontrado por inhibición con NEC-1, reforzando el papel in vivo de la necroptosis en la transición de folículos sanos a atrésicos en folículos antrales pequeños y en el

cambio de pre-quistes a quistes, lo que sugiere que este proceso de muerte celular juega un papel importante en la fisiología ovárica y abre un nuevo blanco farmacológico para tratar patologías ováricas.

En resumen, hemos obtenido importantes evidencias experimentales para comprender la participación de la ACh en la fisiología ovárica en condiciones normales y patológicas, abriendo estudios sobre la relevancia que tiene este sistema de neurotransmisor, hacia estudios farmacológicos para tratar la infertilidad de origen ovárico.

#### Abstract

It is known that the secretion of steroids and the follicular development of the mammalian ovary is controlled by the reproductive hypothalamus through the secretion of GnRH, which via the portal pathway stimulates the secretion of hypothalamic gonadotropins. During the last decade, experimental evidence has been obtained that the autonomic nervous system represents the fine regulation of ovarian function. The sympathetic nervous system, through norepinephrine (NE), regulates steroid secretion and follicular development. Although it is known that the ovary receives parasympathetic innervation via the vagus nerve, there is only isolated evidence on the role of acetylcholine (ACh) in steroid secretion and follicular development in the ovary. Previous studies in our laboratory showed that intrabursal administration of Huperzine A (acetylcholinesterase blocker) for 28 days increases intraovarian ACh levels, favoring follicular development, as demonstrated by the increased number of healthy antral follicles, corpora lutea and greater fertility. It is not yet known whether ACh regulates follicular development or modifies follicular atresia since the number of healthy follicles that ovulate depends on the balance of both processes. The objective of this work was to use biochemical and functional studies to characterize the intraovarian cholinergic system. We propose the following hypothesis: "Intraovarian acetylcholine stimulates rat follicular development,

regulating atresia processes through necroptosis and regulating only indirectly the synthesis of steroids". To do this, a.- we studied the origin of intraovarian ACh; b.- the cellular distribution of muscarinic receptors (MR) of the M1, M3 and M5 subtype; and c.- the participation of MR in ovarian steroidogenesis. We also studied their participation in the ovarian follicular development of animals under normal conditions or exposed to stress conditions in the presence or absence of the muscarinic antagonist, atropine. Regarding the first point, we found that denervation decreased ovarian NE, but not ovarian ACh, evidencing a non-neuronal local source of ACh. Regarding point b.- the M1 are located in the granulosa cells (GC) and especially in the large preantral and antral follicles. M5 are associated with the ovarian vascular system and only traces of M3 were found. Finally, at point c.- ex vivo incubation of ovaries showed that the MR agonist, Carbachol, did not modify either the production of steroids or the expression of biosynthetic enzymes. In vivo studies demonstrated that blockade of cholinergic action by intrabursal administration of the antagonist atropine, in vivo for 28 days, increased atresia of secondary follicles. The results support the existence of an intraovarian cholinergic system in the rat ovary, located mainly in the follicular GC, which is not involved in the production of steroids but rather exerts trophic functions and regulates follicular atresia. Given that one of the most affected factors in follicular development was not only the stimulation of follicular development but also, importantly, follicular atresia -- and due to discrepancies in the literature -- we studied the participation of necroptosis as an important mechanism in follicular atresia. follicular and its modifications in pathological processes. Chronic exposure of the ovary to the direct action of pharmacological inhibitors of the key step in the necroptotic cascade: a. necrostatin-1 (NEC-1) and b. necrosulfonamide (NSA), to inhibit necroptosis, produced important changes in follicular development. The administration of NEC-1 for 28 days increased the number of small atretic follicles and precystic structures (type III follicles). In addition, elevated levels of the necroptotic marker protein MIK1 (mixed lineage kinase domain-like protein) were observed; suggesting that necroptosis would be one of the important factors in the disappearance of atretic follicles and in the transition from type III follicles to cysts. NSA treatment did not change the ovarian

morphology of treated animals, suggesting a minor role in inhibiting necroptosis in rat ovaries. Sympathetic stress (characterized by increased atresia and the development of a polycystic phenotype) increased the Mlkl protein, reinforcing the in vivo role of necroptosis as the main process in the transition from healthy to atretic follicles in small antral follicles and in the change of precysts to cysts, suggesting a new pharmacological target to treat ovary-dependent pathologies.

## **1.Introducción**

### **1. 1 Función Ovárica.**

El ovario es la gónada femenina encargada de la producción de gametos. En este caso, la unidad funcional del ovario es el folículo. La esteroidogénesis o síntesis de hormonas esteroidales (progesterona, testosterona y estrógenos) es la segunda función ovárica y casi exclusiva de este órgano (McGee and Hsueh 2000). Ambos roles son importantes tanto para el desarrollo sexual como para la exitosa reproducción y propagación de la especie.

La esteroidogénesis ovárica se lleva a cabo específicamente en dos tipos celulares que forman parte del folículo: células de la teca y células de la granulosa. Las células de la teca cuentan con las enzimas 3 beta hidroxisteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD) y la Citocromo P450<sub>scc</sub> (side-chain cleavage), que son capaces de convertir el colesterol en progesterona y posteriormente en androstenediona (Dupont et al. 1992). Las células de granulosa presentan la enzima aromatasa capaz de sintetizar estrógenos a partir de testosterona. Estas hormonas son claves para el control del reclutamiento folicular y mantención de la preñez (McGee and Hsueh 2000).

### **1. 2 Desarrollo folicular**

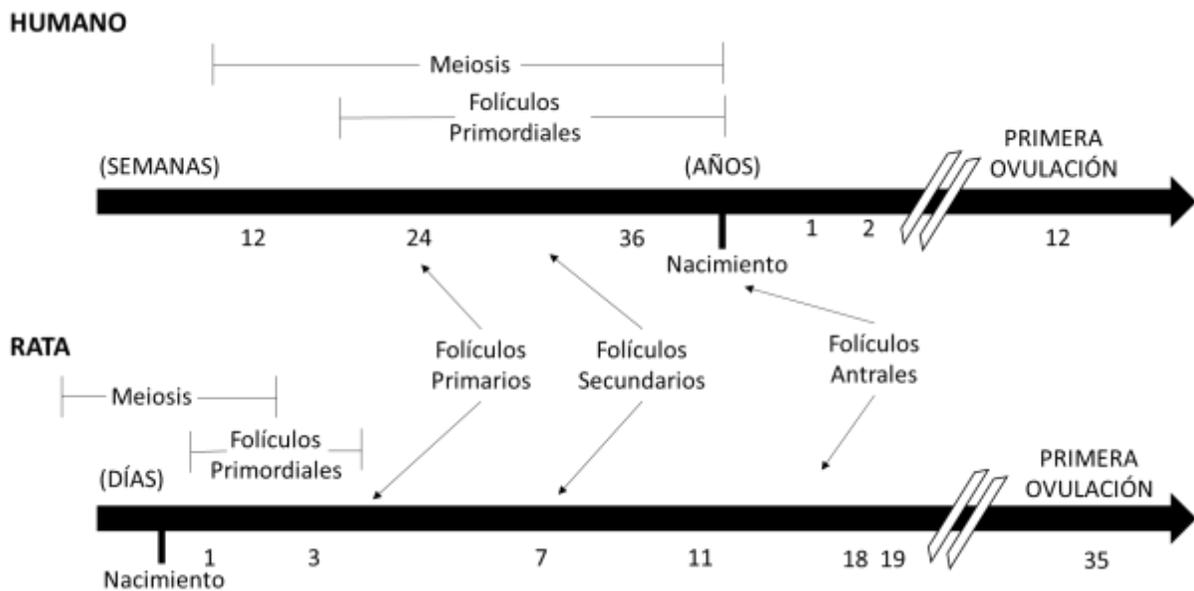
En el caso de la mujer, la gametogénesis está dada principalmente por el desarrollo folicular. Esta se inicia cuando en la séptima semana de gestación las células germinales primordiales llegan a la cresta gonadal del endodermo del saco vitelino, para luego convertirse en ovogonios, los que proliferan por mitosis antes de diferenciarse en ovocitos primarios (McGee and Hsueh 2000; Fauser and Van Heusden 1997). Algunas ovogonias comienzan la transformación en ovocitos primarios y entran en las primeras etapas de la meiosis alrededor de las 11-12<sup>va</sup> semana de gestación (McGee and Hsueh 2000). El número de células germinales alcanzan su punto máximo a las 20 semanas para luego decaer. La formación del folículo primordial comienza alrededor la mitad de la gestación cuando una sola capa de células de pre-granulosas rodea cada ovocito y continúa hasta justo

después del nacimiento. Desde un pico de 6 a 7 millones a las 20 semanas de gestación, el número de ovocitos cae dramáticamente de modo que, al nacer, solo quedan entre 300.000 y 400.000 (Van Wageningen G 1965; Block 1953). Los ovocitos que no están rodeados por células de la granulosa para formar folículos primordiales se pierden por muerte celular. Mientras tanto, algunos folículos primordiales inician el crecimiento (reclutamiento inicial), la mayoría de los folículos en crecimiento progresan a la etapa antral, en cuyo punto inevitablemente sufren atresia, proceso de desintegración o desaparición de folículos (Osman 1985). Después del inicio de la pubertad, un pequeño número de folículos antrales pueden ser rescatado por las gonadotropinas para continuar el crecimiento (reclutamiento cíclico), donde se forman los folículos pre-ovulatorio o de Graaf el que ovulará en cada ciclo (McGee and Hsueh 2000). Durante la vida reproductiva, el crecimiento continuo de los folículos primordiales y primarios en folículos secundarios y más grandes conduce a una disminución gradual en el número de folículos originales. Sin embargo, el desarrollo folicular es considerado un proceso poco eficiente ya que cerca del 99% de los folículos degenera antes de llegar a ovular por un proceso llamado atresia folicular, esto ocurre para asegurar óptimas condiciones al ovocito cuando ovule.

Un buen modelo experimental es la rata, ya que ocurren similares sucesos solo que en tiempos mucho más condensados (ver figura 1). Al final del desarrollo embrionario, las células germinales primordiales migran a la cresta gonadal para convertirse en ovogonios. En el nacimiento, el ovario de rata se compone de cordones y ovogonias. A los 3 días de edad, se forman los folículos primordiales y durante las 3 siguientes semanas la primera oleada de folículos se convierte en folículos antrales (Hirshfield 1989; McGee et al. 1997; Rajah, Glaser, and Hirshfield 1992; Malamed, Gibney, and Ojeda 1992).

De los folículos primordiales, consistentes en el ovocito rodeado de una pre-granulosa, algunos de ellos pasan a formar los folículos primarios, donde ya se puede reconocer las células de la granulosa de forma cuboides y células de la Teca (ver figura 2). Finalmente, en esta etapa de desarrollo pre-antral o reclutamiento inicial, los folículos continúan su desarrollo desde folículos primarios hacia los folículos secundarios, los que ya presentan 2 o más capas de células de granulosa,

son capaces de responder a las gonadotropinas y continuar su desarrollo a folículos antrales (McGee and Hsueh 2000).

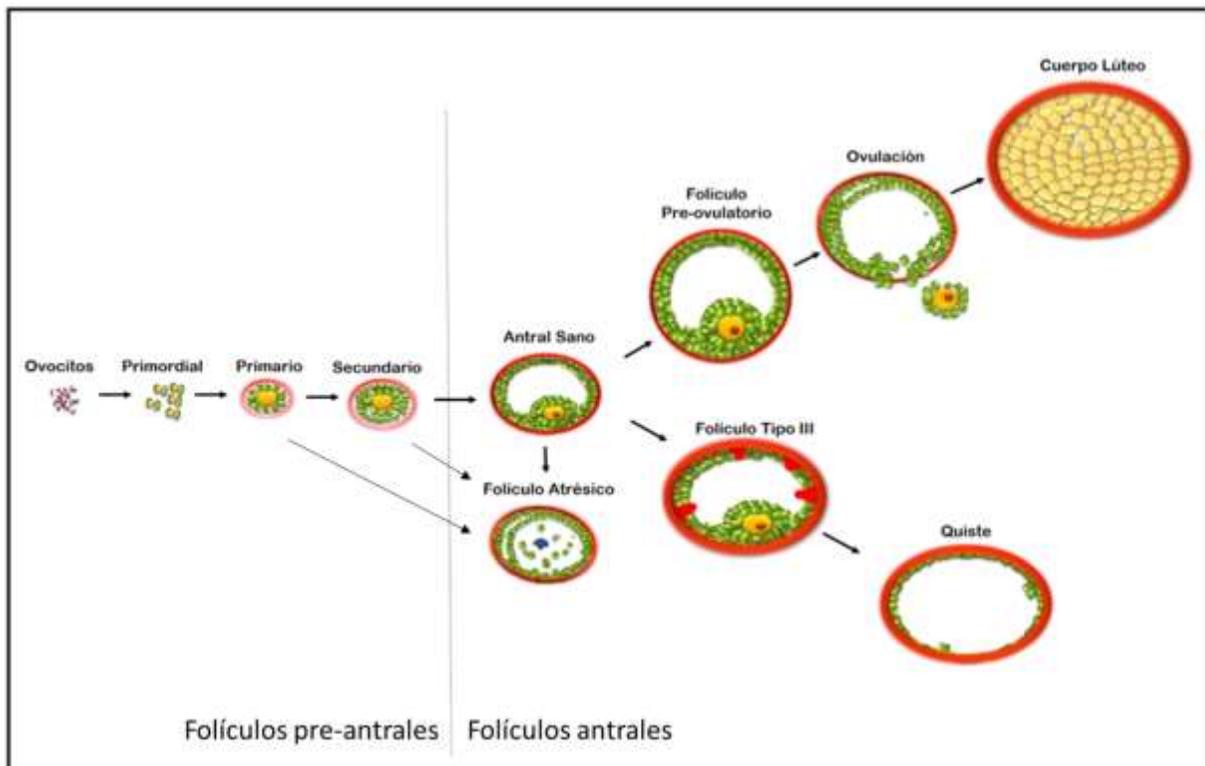


**Figura 1. Hitos del desarrollo folicular durante la vida fetal y neonatal en humanos y roedores.** Cada flecha indica el tiempo (semanas en caso humano y días en el de rata) que toma la formación de las distintas poblaciones foliculares, destacando y comparando los hitos más importantes para cada caso. Adaptación de McGee et al 2000.

En esta segunda etapa del desarrollo de los folículos, donde ya responden a gonadotropinas, especialmente a la hormona folículo estimulante (FSH), los folículos crecen, aumentan las capas de granulosa y forman un antro hasta que con el *peak* de hormona luteinizante (LH) ocurre la ovulación (McGee et al. 1997; Hsueh et al. 1984). Posterior a esto, las células de granulosa y teca remanentes se luteinizan y forman el Cuerpo lúteo, el que cumple el rol de mantener los niveles de progesterona durante las primeras etapas de la preñez (Fauser and Van Heusden 1997). Sin embargo, la rata también es capaz de formar de manera espontánea quistes, que consisten en estructuras formadas principalmente de células de la Teca y cuya presencia se relaciona con un aumento en la testosterona. A medida que envejece la rata y va perdiendo su capacidad reproductiva, estas estructuras se hacen más comunes y prevalentes (Acuna et al. 2009). Una interesante estructura son los folículos tipo III o estructuras pre-quísticas, las que corresponderían a

folículos que no ovularon y no se van a atresia, convirtiéndolos así en la instancia previa a los quistes, la que también aumenta en número con el envejecimiento y se relaciona con la pérdida de la capacidad reproductiva del animal (Acuna et al. 2009; Brawer, Richard, and Farookhi 1989).

En todo este desarrollo, es muy importante la participación de los procesos de proliferación, muerte celular y de su regulación, del equilibrio de estos procesos depende la mantención del desarrollo folicular y una ovulación exitosa.



**Figura 2. Esquema del desarrollo folicular en ratas.** Representación de los distintos estados de desarrollo de los folículos en rata. Cada flecha indica el siguiente paso o alternativas en el desarrollo folicular.

### 1.3 Control de la función ovárica

El funcionamiento del ovario en mamíferos, tal como ocurre con otros órganos, depende de la acción concertada de distintos tipos de señales moleculares, tanto de tipo hormonal como neuronal. Está bien documentado que la función ovárica es regulada por el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada (Fauser and Van Heusden 1997),

como así también por una inervación extrínseca neuronal, compuesta por diversos nervios de tipo sensorial, así como también por el sistema nervioso simpático (Ricu et al. 2008). Este último, posee neuronas que inervan directamente distintas estructuras del ovario, como vasos sanguíneos, tejido conectivo y folículos, esto con el fin de controlar el funcionamiento ovárico mediante la liberación de noradrenalina y los receptores adrenérgicos presentes en el ovario (Dissen Gregory A. 2004). La inervación extrínseca del ovario se proyecta mediante dos vías: plexo nervioso (PN) y Nervio Ovárico Superior (SON), el cual está asociado al ligamento suspensorio ovárico y cuyos cuerpos neuronales se localizan en el Ganglio Celiaco y los axones se proyectan hacia folículos en crecimiento del ovario.

Igualmente, se ha encontrado evidencia que el sistema nervioso parasimpático podría estar participando en el control de la función ovárica. Mediante estudios de trazado viral transneuronal, se ha descrito que la inervación parasimpática llega al ovario a través del Nervio Vago (NV) y vías sensoriales aferentes que nacen desde el Núcleo Vagal en el Bulbo Raquídeo o Medula Oblonga, cuyo control es precedido por el Núcleo Paraventricular en Hipotálamo (Gerendai 2002; Gerendai et al. 1998). A nivel intra-ovárico, se ha descrito la presencia de acetilcolinesterasa (AChE) en nervios ováricos perivasculares el cual se correlaciona con el patrón visto en nervios adrenérgicos asociados a vasos sanguíneos (Burden and Lawrence 1978). En estudios más recientes, no ha sido posible identificar a la enzima que sintetiza a la Acetilcolina, la Colina Acetiltransferasa (ChAT), en las fibras nerviosas asociadas a los folículos ováricos, así como lo hacen las fibras nerviosas simpáticas, pero esta enzima si está presente en células endocrinas del ovario sugiriendo un tipo de inervación colinérgica intra-ovárica no-neuronal (Fritz et al. 1999; Fritz et al. 2001).

#### **1.4 Evidencias de un sistema Colinérgico Intrínseco en Ovario**

Se ha descrito en ovario la presencia de todo el sistema de síntesis, liberación y degradación de la acetilcolina (ACh), tanto en roedores como en primates y humanos (Fritz et al. 1999; Mayerhofer and Fritz 2002). En estas especies se encontró Acetilcolinesterasa (AChE) en células de la granulosa, encontrándose

mayor cantidad de ésta enzima en folículos de mayor tamaño en comparación a los pre-antrales, sugiriendo la participación local de este sistema en el desarrollo folicular (Fritz et al. 1999). En células de la granulosa humana (derivadas de folículos pre-ovulatorios obtenidos de pacientes que se someten a fecundación asistida), se observó que estas células eran capaces de producir Acetilcolina (ACh), y además se identificó tanto el mensajero como la proteína del transportador vesicular de ACh (VAChT)(Fritz et al. 1999), es decir, el **sistema de síntesis y recaptación de ACh está presente en el ovario, pero a través de un tipo celular no neuronal**, pero aún queda por esclarecer la relevancia fisiológica de este sistema en el ovario.

Así mismo, se ha descrito la presencia de los receptores muscarínicos acoplados a proteína Gq de distintos tipos: M1, M3 y M5, tanto en células de la granulosa (M1 y M5) como en el ovocito (M3) en ovarios de primates humanos y no humanos (Fritz et al. 1999; Mayerhofer and Fritz 2002). En relación a su funcionalidad, la activación de estos receptores con análogos de ACh, provocan un incremento en las concentraciones de calcio intracelular libre, a través de su movilización de depósitos intracelulares (Mayerhofer et al. 1992). A consecuencia de esto, se produce una hiper-polarización de membrana que permite la apertura de canales de potasio operados por calcio (BKCa) y otros canales operados por voltaje, que permiten que las gonadotropinas induzcan la producción de esteroides (Mayerhofer and Kunz 2005; Kunz et al. 2002), lo que da cuenta de un posible rol regulatorio de la ACh en ovario en la esteroidogénesis, a través de un control de tipo auto/para-crino. Obviamente, son necesarios otros estudios para corroborar si es un efecto directo de la activación muscarínica o de la facilitación para la acción de las gonadotropinas en la producción de esteroides. Los mismos autores sugieren también que la ACh podría tener un rol trófico en células de la granulosa, ya que es capaz de producir una disrupción en las *gap junctions* entre estas células, lo que conduce a la proliferación celular (Mayerhofer and Fritz 2002; Mayerhofer and Kunz 2005; Sommersberg et al. 2000).

Estudios realizados *in vivo*, mostraron que el aumento local de la ACh intra-ovárica, a través del uso del inhibidor farmacológico de la AChE, Huperzina A, aumentó el

desarrollo folicular, el número de folículos secundarios sanos de tamaño pequeño, los cuerpos lúteos y la fertilidad en ratas, lo que nos sugiere que la función del ovario sería controlada también por el sistema parasimpático (Urra et al. 2016). Curiosamente, junto al aumento intra-ovárico de acetilcolina, también existe un aumento en los folículos antrales atrésicos, estructuras que normalmente se encuentran en el ovario, sin embargo, su aumento está relacionado a pérdida de la reserva folicular y fin de la vida reproductiva.

### **1.5 Efectos de la sobre-activación simpática en el modelo de estrés por frío**

Está bien descrito que la sobre-activación simpática crónica desarrolla un fenotipo poli-quístico (Greiner et al. 2005; Ricu et al. 2008). De hecho, la exposición de ratas adultas al estrés por frío, aumenta la actividad simpática y los niveles de NA en el ovario (Dorfman et al. 2003; Bernuci et al. 2012; Bernuci et al. 2008; Barra et al. 2014) sin aumentar los niveles de corticosterona (Pacak, Palkovits, et al. 1998; Dorfman et al. 2003). El aumento de la NA ovárica después de 28 días de estrés por frío crónico está relacionado con alteraciones en el desarrollo folicular, como la disminución de folículos secundarios, la aparición de folículos con hipertrofia de la capa de teca (Dorfman et al. 2003; Zangeneh et al. 2011; Park et al. 2012), y recientemente se ha descrito un aumento en la proporción de atresia folicular (Riquelme et al. 2019). Cuando posterior a la exposición al estrés por frío de 28 días en ratas, se estudia el desarrollo folicular 28 días después, el ovario aún presenta folículos con hipertecosis, folículos pre-quísticos y la presencia clara de quistes foliculares, lo que implica el desarrollo de un fenotipo de ovario poli-quístico que se acompaña además con hiperandrogenismo (Bernuci et al. 2012). En este periodo se evidencia, además, un aumento en la atresia folicular y disminución de la fertilidad (Riquelme et al. 2019). Si bien se ha caracterizado que durante las primeras semanas de estrés por frío aumenta tanto la ACh como la NA, se ve que 28 días posteriores al estrés se mantienen elevados solo los niveles de NA no así los de ACh, los que vuelven a niveles normales. Por esta razón se atribuyó que el principal efecto observado posterior al estrés por frío es debido a una acción de la NA. **Aún falta por esclarecer los efectos que provocaría este aumento inicial**

**de ACh durante el estrés y de existir, mediante que receptores realizaría su efecto.**

### **1.6 Atresia folicular**

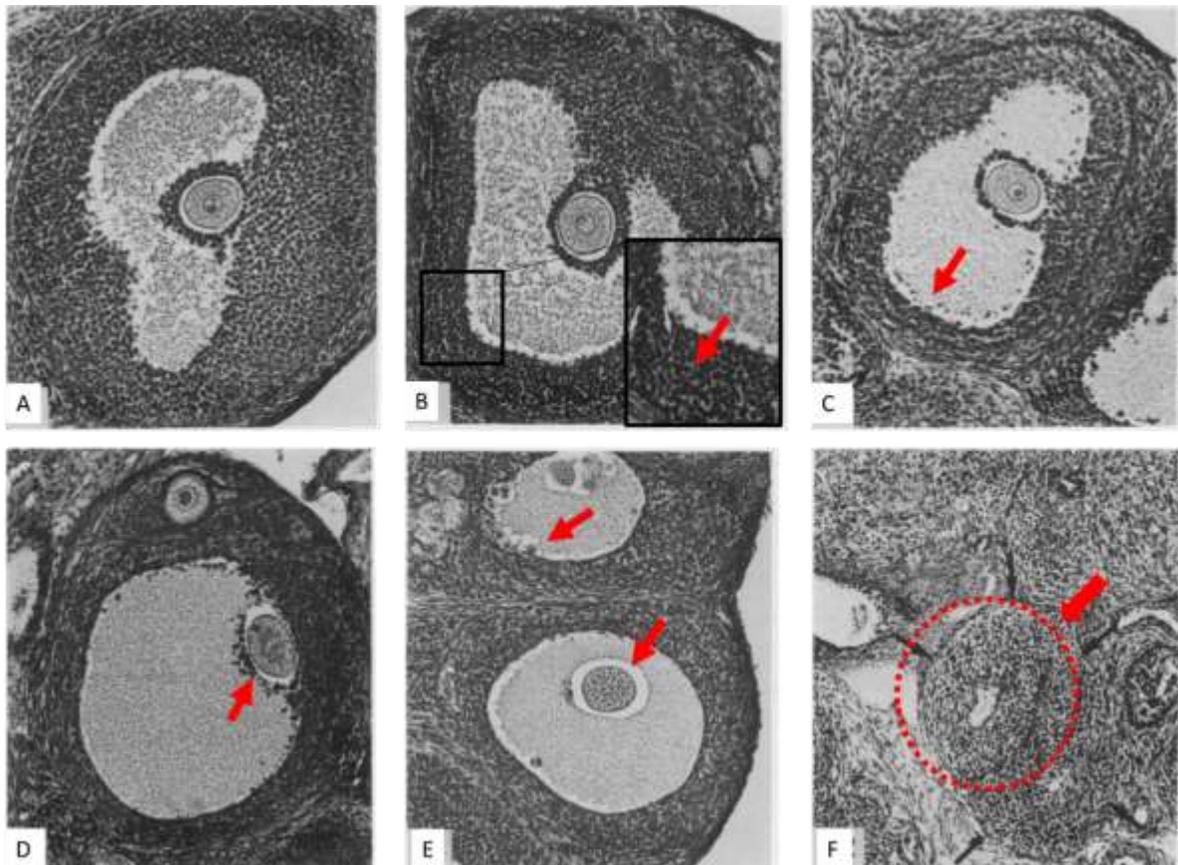
Se entiende como atresia al proceso de degeneración o desaparición de estructuras foliculares, asegurando que solo folículos sanos y que conservan al ovocito en óptimas condiciones sean capaces de ovular. Aunque la atresia folicular está presente en todas las etapas del desarrollo folicular, esta presenta una mayor incidencia cuando los folículos son dependientes de FSH, en estados tempranos de los folículos antrales. Los folículos pre-antrales y pre-ovulatorios raramente presentan atresia (Chun, Eisenhauer, Minami, Billig, et al. 1996). En este proceso participan distintos tipos de muerte celular dependiendo de la estructura folicular y etapa de desarrollo en que se encuentre el organismo.

De acuerdo al criterio de Orson 1985 (Osman 1985), se pueden distinguir dos fases en la atresia folicular de folículos antrales: en la fase I, los cambios degenerativos están presentes solo en la pared de la granulosa que muestra encogimiento celular, picnosis y cariorrexis. Esta fase se caracteriza por fragmentación destructiva del núcleo de una célula senescente, donde la cromatina se distribuye irregularmente por el citoplasma, evento que suele ocurrir como resultado de muerte celular programada, senescencia celular o necrosis. En esta etapa los folículos aún son esféricos u ovoides (figura 3B). En la fase II, los cambios ocurren también en el ovocito, los que muestran signos de reanudación de la meiosis, como la ruptura de la membrana nuclear con o sin formación de un pseudo-huso de maduración y fragmentación de ovocitos. En el caso de los folículos antrales, sus ovocitos pueden reanudar la meiosis espontáneamente después de la degradación de las células de la granulosa (W.-D. Foote 1969). En esta etapa la mayoría de los folículos muestran deformidades (formas no ovaladas), probablemente debido a la pérdida de tono de la pared y a la compresión de las estructuras circundantes.

Los folículos en la fase I se pueden subdividir en la fase IA, donde hay una evidente contracción de la pared de la granulosa visto con un aumento bajo, y es posible ver

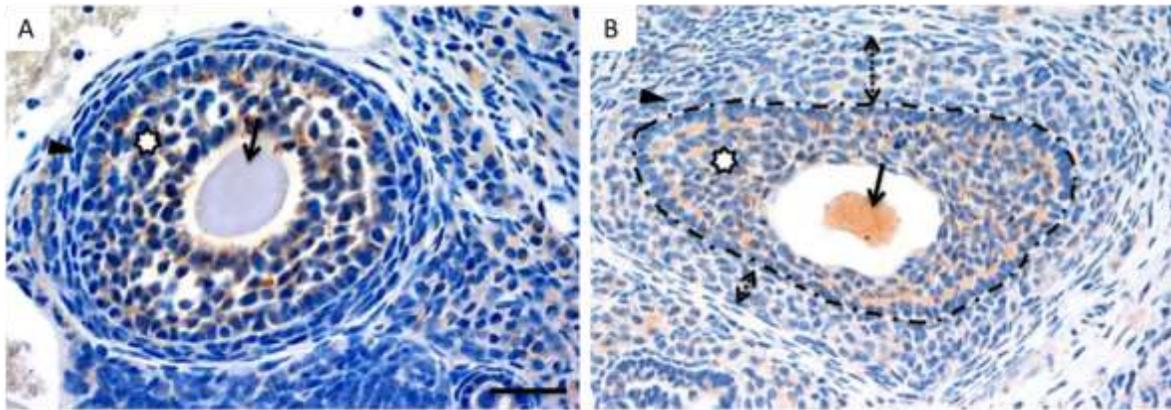
cambios degenerativos en pequeñas áreas dispersas a mayor aumento (ver figura 3 B). La fase IB se observa que toda la pared de la granulosa está afectada por la degeneración. En esta etapa se ven muchos fragmentos nucleares en la periferia del antro (figura 3C). La fase II también se divide en dos etapas, la fase IIA, donde el ovocito en degeneración todavía está rodeado por una envoltura de células del cúmulo en degeneración o de sus restos (ver figura 3D). La fase IIB, el ovocito se encuentra desnudo en el antro y la pared de la granulosa suele tener un revestimiento interior definido. No se ven partículas nucleares en el antro o se ven pocas, pero los macrófagos suelen estar presentes (ver figura 3E).

Los folículos atrésicos más viejos, que fueron descritos por Osman pero no clasificados ni cuantificados, no presentan ovocitos, la pared de granulosa también desaparece y es posible observar macrófagos en el antro (ver figura 3F). También presentan la teca muy engrosada. Una vez finalizado este proceso, quedan remanentes foliculares que pasaran a ser parte del tejido ovárico o estroma.



**Figura 3. Clasificación de folículos atrésicos.** Folículo antral sano (A); Folículo atrésico IA, la flecha indica los núcleos picnóticos y las partículas nucleares entre las células de la granulosa (B); folículo atrésico IB, la flecha indica partículas nucleares presentes en la periferia de la cavidad. El ovocito se encuentra todavía en la etapa de vesícula germinal (C); folículos atrésicos IIA, la flecha indica la desintegración de las células del cúmulo (D); folículo atrésico IIB, las flechas indican presencia de macrófagos y ovocito desnudo (E); folículo atrésico viejo, se muestra una capa tecal gruesa y un pequeño remanente del antro (F). Figura modificada de Osman 1985.

Aunque en general no se hace distinción entre los folículos antrales y pre-antrales, evidencias histológicas dan cuenta que podría existir diferencias entre la regulación de la degeneración de folículos antrales y pre-antrales. De acuerdo a lo reportado por Spanel-Borowski (Meng et al. 2018; K. 2012), en perras se observan dos tipos de patrones atrésicos. El tipo A en el que el ovocito degenera mientras que las células de granulosa permanecen intactas, y un tipo B en el que las células de la granulosa muestran signos de degeneración extensa mientras que el ovocito no se ve afectado inicialmente. De acuerdo a los análisis histológicos, el tipo A estaría más presente en la atresia de folículos pre-antrales, mientras que el B en folículos antrales. De acuerdo con estos hallazgos, Teerds y Dorrington (Teerds and Dorrington 1993) informaron diferencias histológicas en la atresia de los folículos pre-antrales y antrales. En la atresia de folículos pre-antrales se presenta fragmentación de ovocitos, desorden en la capa de granulosa y capa de teca hipertrofiada (figura 4B), mientras que en los folículos antrales hay apoptosis masiva de células de la granulosa en presencia de un ovocito más o menos intacto (figura 4A). Sin embargo, **los distintos tipos de muerte celular que participan en los distintos tipos de estructuras foliculares aún no está del todo esclarecido** y es importante conocer estos mecanismos involucrados para poder revertir patologías donde la atresia aumente y prevenir la pérdida folicular.



**Figura 4. Atresia folículos pre-antrales.** Folículo pre-antral sano (folículo secundario) (A); folículo pre-antral atrésico (B). Figura modificada de Meng et al, 2018.

### 1.7 Tipos de muerte celular presente en ovario

En ovarios de mamíferos se pierden al menos  $2/3$  de las células germinales debido a la muerte celular. Sin embargo, los mecanismos exactos de muerte celular involucrados en cada etapa del desarrollo aún no han sido esclarecido del todo. Por ejemplo, en murinos, en las crestas gonadales y en los ovarios neonatos se han descrito 3 distintos tipos de muerte celular: apoptosis, autofagia y necrosis (Pajokh et al. 2018). La apoptosis es un tipo de muerte celular ampliamente conocido, donde se describen dos vías: la vía intrínseca y la vía extrínseca. La vía extrínseca es activada por una familia de receptores, por ejemplo, los receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) (Hussein 2005). La vía intrínseca elimina las células que están privadas de factores de crecimiento vitales o células cuya homeostasis ha sido alterada. Enzimas, como las cistein-proteasas (caspasas) juegan un rol importante en este tipo de muerte celular. Las caspasas permiten los cambios morfológicos en la apoptosis, rompiendo los principales componentes de la célula (Hussein 2005; Ziegler and Groscurth 2004).

La muerte celular autofágica se asocia con la formación de estructuras de doble membrana que rodean los materiales autofágicos o autofagosomas; posteriormente se fusionarán con los lisosomas (Levine and Yuan 2005).

Por su parte, la necrosis es un tipo de muerte de celular que se caracteriza por el daño en el ADN en ausencia de efectores apoptóticos esenciales, como el antagonista/asesino homólogo de Bcl2 (BAK), y la proteína X asociada a Bcl2 (BAX). También se caracteriza por la hinchazón de los organelos, aumento de los niveles citoplasmáticos de especies reactivas de oxígeno (ROS) y calcio, disminución de los niveles citoplasmáticos de ATP, activar la catepsina proteasa y eventualmente destruir organelos y membranas celulares (Moreno-Gonzalez, Vandenabeele, and Krysko 2016). Por esta última razón es que este tipo de muerte celular tiene características morfológicas muy particulares y distintas a las de la apoptosis.

En ratón se ha visto que la apoptosis es el principal tipo de muerte celular presente en las células germinales en los ovarios perinatales, mientras que la autofagia es dominante en los ovarios de los neonatos (Pajokh et al. 2018). La Necrosis se ha visto que es fundamental en la muerte de células germinales en el periodo perinatal, probablemente tan fundamental como el papel que juegan la apoptosis y la autofagia (Pajokh et al. 2018).

Sin embargo, como hemos visto anteriormente, a medida que el animal crece y llega a la maduración sexual, el desarrollo folicular se complejiza. Al crecer los folículos, algunos de ellos serán reclutados para la ovulación, dando origen a las estructuras anteriormente descritas. Por lo tanto, las participaciones de las distintas formas de muerte celular son necesarias y cambian con el desarrollo.

Recientes trabajos han mostrado que la muerte por autofagia sería importante en la atresia de los folículos pre-antrales y la apoptosis en los folículos antrales, esto dado a la presencia de marcadores moleculares claves en este proceso, como lo son la proteína 3 de cadena ligera asociada a microtúbulos (LC3), *sequestosome 1* (SQSTM1/P62), Beclin1, proteína 7 relacionada con la autofagia (ATG7) y caspasa 3 escindida (cCASP3) respectivamente (Pajokh et al. 2018). Sin embargo, falta aún evidencia para esclarecer, por ejemplo, la muerte celular de las células de la teca, ya que no se han registrado algunas de estas marcas en este tipo celular, como también aclarar si estos tipos de muerte celular son los encargados de la degeneración completa del folículo atrésico (en sus etapas finales) y/o quísticos.

Investigaciones de los últimos años han dado cuenta la existencia de una nueva muerte celular llamada necroptosis, la cual tiene características morfológicas muy similares a la necrosis pero es altamente regulada (Jouan-Lanhouet et al. 2014; Zhou and Yuan 2014).

### **1.8 Necroptosis**

La necrosis a diferencia de la necroptosis, es definida como una forma pasiva de muerte celular sin los intrincados mecanismos reguladores que son característicos de la apoptosis (Vanden Berghe et al. 2014; Ziegler and Groscurth 2004), la que se presenta por estrés físico, se considera accidental y ocurre independientemente de las vías de transducción de señales. Morfológicamente esta se presenta como la hinchazón de la célula y organelos con el posterior vertido del contenido intracelular al exterior (Ziegler and Groscurth 2004). La Necroptosis, por su parte, es un tipo de muerte celular que contiene características morfológicas de la necrosis pero es altamente regulada y no involucra la participación de reguladores de la apoptosis como lo son las caspasas o miembros de la familia de las proteínas Bcl-2 (Degterev, Ofengeim, and Yuan 2019; Degterev et al. 2005).

Los mecanismos que desencadenan la necroptosis no son del todo conocidos, sin embargo, se ha estudiado como este proceso es desencadenado principalmente por la activación de los receptores: tipo toll (TLR4 y TLR3), TNF, FAS y de patógenos. La activación de estos receptores desencadena la asociación de complejos proteicos a nivel citocelular, donde participan las proteínas quinasas que interactúan con el receptor 1 y 3 (RIPK1 y RIPK3) activas y fosforiladas, que forman el necrosoma. Este complejo proteico, llamado necrosoma, fosforila a la proteína *Mixed Lineage Kinasedomain-Like* (MLKL), produciendo su dimerización y asociación a canales iónicos o bien ella misma forma un poro, capaces de producir un incremento de sodio y calcio intracelular, produciendo el colapso de la célula (Conrad et al. 2016; Sun et al. 2012; Zhou and Yuan 2014). Esta desintegración celular incluye inflamación osmótica (oncosis), lisosomal y eventualmente permeabilización de la membrana plasmática. El estudio de este tipo de muerte

celular ha adquirido gran importancia debido a su participación en patología de diversas enfermedades, tales como daño por isquemia y re-perfusión (Oerlemans et al. 2012), hepatitis aguda (Li et al. 2014), enfermedades neurodegenerativas (Qinli et al. 2013) entre otras.

### **1.9 Inhibidores de la Necroptosis: Necrostatina-1 y Necrosulfonamida**

Como ya se ha mencionado anteriormente, la necroptosis es una muerte celular con características similares a la necrosis. La característica de muerte celular con necrosis está presente en una variada cantidad de patologías humanas agudas, que incluyen el infarto de miocardio, isquemia cerebral e insuficiencia orgánica aguda, por lo que el estudio de inhibidores de la necroptosis podría brindar la posibilidad de controlar la muerte con características de necrosis ofreciendo alternativas terapéuticas de algunas patologías. Es por esta razón que se han desarrollado una gran variedad de inhibidores de proteínas clave en la cascada de transducción de la necroptosis. Uno de esto es la Necrostatina-1. Las necrostatinas son una familia de compuestos con diversas estructuras químicas que han sido nombradas así por su capacidad para bloquear la muerte necrótica. Nec-1 corresponde a un inhibidor alostérico de RIPK1, el que fue identificado en 2005 por Alexei Degterev y Junying Yuan como un compuesto que bloquea la muerte celular necrótica en células humanas y murinas. Nec-1 se ha usado ampliamente para bloquear la actividad de la quinasa RIPK1 en varios modelos de enfermedades experimentales, como lesión por isquemia-reperfusión en el cerebro, el corazón y el riñón, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, sepsis y muerte celular retiniana.

Otro compuesto utilizado con estos fines es la necrosulfonamida (NSA). Este sería el único compuesto conocido capaz de unirse directamente a la proteína Mixed Lineage Kinase domain-Like (MLKL). MLKL es la proteína efectora más importante de la vía transcripcional de la necroptosis. Esta consiste en una proteína multidominio con un dominio de 4 hélices (4HB) y un dominio pseudoquinasa (PsK) conectados por hélices de refuerzo. La fosforilación del dominio PsK de MLKL es un paso clave hacia la oligomerización del dominio 4HB que provoca la muerte celular. Esta proteína es antecedida por la formación de la heterooligomerización de

RIPK1 y 3 para formar el necrosoma. RIPK3, a su vez, activa a la proteína MLKL por fosforilación en el PsK, en el caso humano en los residuos Thr357 y Ser358. Esta fosforilación provocaría un cambio conformacional que permitiría la oligomerización de MLKL a través de sus dominios 4HB. NSA interrumpe esta forma activada y causa dos efectos principales en la conformación de MLKL: (1) bloqueando la orientación relativa de los dominios 4HB y PsK mediante la formación de varias interacciones nuevas y (2) previniendo la participación de residuos en el dominio 4HB claves para participar en el entrecruzamiento para la formación de oligómero.

### 1.10 Necroptosis en el ovario

Este tipo de muerte celular se ha visto que también está presente en ovario. En cultivos de células de granulosa humana y ovario de primate fue posible evidenciar las proteínas RIPK1, RIPK3 y MLKL en su estado activo (fosforilado) (Blohberger et al. 2015). Junto a esto, se identificó MLKL-P en cortes de tejido ovárico en folículos antrales y pre-antrales. En cultivos de folículos en 3D con inhibidores de la necroptosis (NEC-1), se observó un aumento en el tamaño de los folículos estudiados (Du et al. 2018), reforzando la idea que éste proceso sería relevante en el desarrollo de estas estructuras. Otros trabajos han demostrado la posible participación de la necroptosis en la luteólisis (Bagnjuk et al. 2019; Hojo et al. 2016). Hojo et al, caracterizaron los niveles de mensajero y proteicos de RIPK1, RIPK3 y MLKL en los distintos estadios de la vida del cuerpo lúteo en bovinos (Hojo et al. 2016), estando principalmente aumentados los niveles de RIPK1 y RIPK3 a partir de los estadios tardíos de regresión del cuerpo lúteo (Hojo et al. 2016). **No obstante, aún no se sabe la relevancia fisiológica de este proceso en este órgano, ni tampoco si este sería relevante en el proceso desarrollo folicular.**

Dado el creciente interés en comprender la Necroptosis, y su participación en la génesis de diversas patologías, se han desarrollado inhibidores farmacológicos para el estudio de este proceso incluyendo al ovario. En el caso de NEC-1 (inhibidor alostérico de la RIPK1 y por ende de la necroptosis, (Conrad et al. 2016), se ha

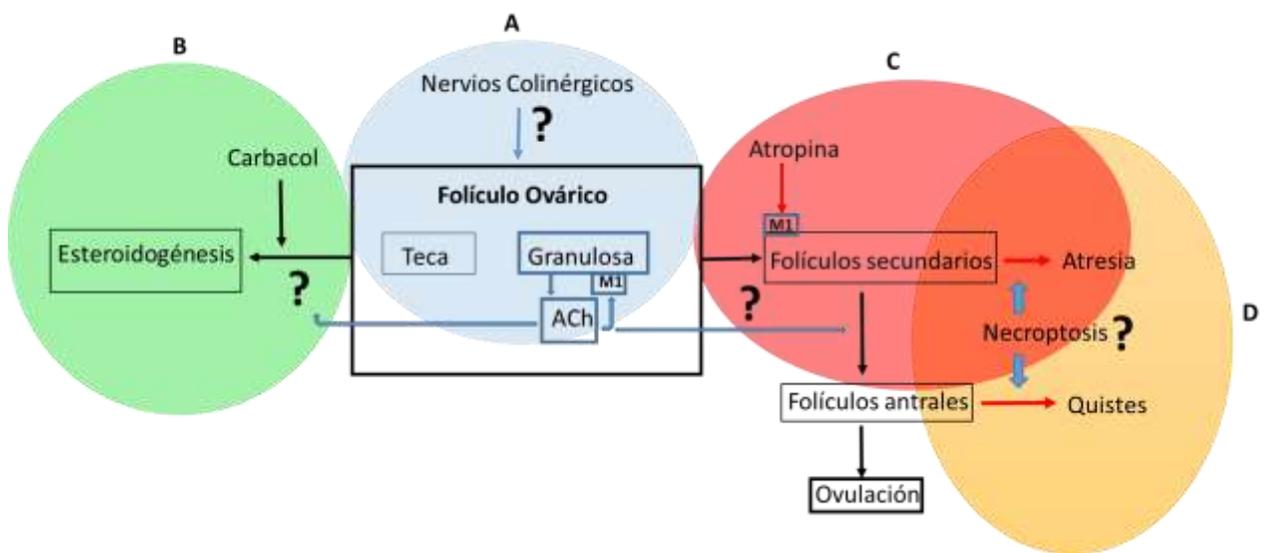
probado su uso en cultivos de células de granulosa humana y cultivos de folículos en 3D (Blohberger et al. 2015; Du et al. 2018). De igual forma un segundo inhibidor como la NSA (que inhibe MLKL por bloqueo de su translocación a la membrana (unión a lípidos fosfatidilinositol y cardiopina) (Wang et al. 2014), también se ha evidenciado en células de granulosa ováricas humanas (Blohberger et al. 2015). Es decir, se ha probado que la necroptosis es un evento importante en el desarrollo folicular y actuaría a distintos niveles del desarrollo de los folículos ováricos desde los folículos primarios, secundario y antrales para afectar la ovulación, evento fundamental en la reproducción. Aun no existen evidencias de que este proceso tenga relevancia in vivo y menos aún en condiciones en que la función ovárica está comprometida como en las fallas en la síntesis de esteroides y en el desarrollo folicular como el síndrome del ovario poli-quístico, la patología ovárica de mayor frecuencia en la vida reproductiva de la mujer.

En resumen, y considerando las siguientes evidencias en que:

- Se ha evidenciado los componentes de un sistema colinérgico en ovario, sin conocerse su origen como parte de nervios extrínsecos o propios del ovario (intrínseco) (figura 5, parte A)
- Se han identificado los receptores muscarínicos en cultivos celulares o en cortes de tejido ovárico, pero aún no hay evidencia de las estructuras donde estos receptores estarían presentes en el ovario y su función. (figura 5 parte C)
- En el modelo fisiopatológico de estrés por frío, aumenta la NA y la ACh, existiendo una estrecha asociación con procesos de atresia folicular y la formación de quistes ováricos, sin embargo, no se conoce el rol de la ACh y de los receptores muscarínicos en el desarrollo de este fenotipo ni tampoco en los mecanismos de atresia folicular característicos de esta condición experimental (figura 5, parte B y C)

- Se sabe que la necroptosis es un proceso de muerte celular que participa en el desarrollo de los folículos ováricos, pero aún no se esclarece cuál sería su relevancia fisiopatológica en la función ovárica (figura 5, parte D)

Nos planteamos responder algunas de estas interrogantes y hemos diseñado un esquema de trabajo que nos permita en una primera parte esclarecer el origen de la inervación colinérgica del ovario; caracterizar los receptores muscarínicos a nivel celular en los distintos folículos y estudiar el rol de los receptores muscarínicos en el fenotipo poli-quístico producido por estrés por frío, caracterizado por el aumento en atresia y formación de quistes. En una segunda parte, mediante herramientas farmacológicas (necrostatina-1 y la Necrosulfonamida), nos proponemos estudiar el rol que tendría la Necroptosis en la atresia folicular y formación de quistes como una estrategia farmacológica que pudiera ser útil para regular los cambios en el desarrollo folicular que se producen en condiciones patológicas del ovario como lo es el ovario poli-quístico.



**Figura 5: Esquema resumen.** Origen de la inervación colinérgica (A); rol de la ACh en la esteroidogénesis (B); rol de los receptores muscarínicos en el desarrollo folicular (C); participación de la Necroptosis en el desarrollo folicular (D).

Del conjunto de estas evidencias es que postulamos la siguiente Hipótesis:

## 2.1 HIPÓTESIS

**“La acetilcolina intra-ovárica estimula la síntesis de esteroides y el desarrollo folicular de rata mediante la activación de receptores muscarínicos; favorece el desarrollo folicular inhibiendo el proceso de atresia vía necroptosis presente en un modelo de estrés”**

## 2.2 OBJETIVO GENERAL

**Determinar el origen de la innervación colinérgica, estudiar el efecto de la activación muscarínica sobre el desarrollo folicular de rata y síntesis de esteroides. Determinar los efectos en un modelo patológico producido por estrés sobre el sistema colinérgico y la participación de la necroptosis.**

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

### **2.3.1 Objetivo 1:**

- A. Esclarecer el origen de la innervación colinérgica del ovario
- B. Caracterizar los receptores muscarínicos a nivel celular en los distintos folículos
- C. Activación de los receptores y síntesis de esteroides
- D. Efecto de la inhibición de los receptores en el desarrollo folicular

**2.3.2. Objetivo 2:** Efectos de los receptores muscarínicos en un modelo de fenotipo de ovario poli-quístico producido por estrés por frío

**2.3.3. Objetivo 3:** Estudiar, mediante herramientas farmacológicas (necrostatina-1 y la Necrosulfonamida), el rol que tendría la Necroptosis en la atresia folicular y formación de quistes asociada al fenotipo poli-quístico

### 3 Material y Métodos

**3.1 Animales:** Se utilizaron ratas hembras Sprague-Dawley obtenidas desde el bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Se trabajó con ratas adultas que presentaron dos ciclos regulares de 4 días consecutivos, previos a la intervención. Todos estos animales fueron mantenidos en condiciones constantes de luz (ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad), temperatura (21-23°C) y con alimentación y agua *ad libitum*. La eutanasia se realizó por decapitación, en el primer estro posterior a los 28 o 56 días de acuerdo al grupo de estudio, (tabla 1). Todos los procedimientos que se realizaron en este trabajo fueron aprobados previamente por el comité de ética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile y ejecutados de acuerdo a la “Guía Para El Cuidado y Uso De Animales De Laboratorio” de la *National Academy of Sciences*. Para la eutanasia por decapitación, se siguió las recomendaciones de AVMA, *Guidelines for the Euthanasia of Animals* (2020 Edition).

Se ocupó un total de 72 animales, los cuales se distribuyeron de la siguiente manera:

Objetivo	Condición	Edad (días)	Número de animales	Estudio en ovario
Estudios de inervación simpática	SHAM	90	4	ACh, NA
	Denervación (SONX o PNX)	90	8	ACh, NA
Administración intra-ovárica de atropina por 28 días	Control	90	4	Morfología
	Atropina	90	4	Morfología
	Estrés	90	4	Morfología
	Estrés + atropina	90	4	Morfología
Administración intra-ovárica de NEC-1 por 28 días	SHAM	90	5	WB, Morfología
	Bomba con NEC-1	90	5	WB, Morfología
	SHAM	90	6	WB, Morfología

<b>Administración intra-ovárica de NEC-1 por 28 días y 28 días sin administración</b>	Bomba con NEC-1	90	6	WB, Morfología
<b>Administración intra-ovárica de NSA por 28 días semanas</b>	SHAM	90	3	WB, Morfología
	Bomba con NSA	90	3	WB, Morfología
<b>Tratamiento de estrés por frío por 28 días</b>	Control	90	4*	WB, IHQ
	Estrés	90	4*	WB
<b>Tratamiento de estrés por frío por 28 días y 28 días sin estrés</b>	Control	90	4*	WB
	Estrés	90	4*	WB

\*Las muestras del grupo estrés 4 semanas de estrés y 4 semanas sin estrés corresponden a muestras obtenidas de la Tesis Doctoral de Raúl Riquelme, cuyos protocolos de estrés simpático se detalla a continuación.

**3.2 Estudios de denervación:** transección del nervio ovárico superior (SON) y plexo ovárico (PN). El SON fue seleccionado para la transección porque lleva fibras simpáticas que inervan predominantemente el componente endocrino del ovario, en contraste con el PN, que inerva principalmente la vasculatura ovárica (Gerendai 2002; Lawrence and Burden 1980). Cuatro ratas adultas fueron anestesiadas con una dosis intraperitoneal (i.p.) de ketamina 60 mg/kg/xylazina 10 mg/kg solución bajo condiciones asépticas, los ovarios bilaterales fueron expuestos a través de una incisión dorsal, y el SON (acompañado con el ligamento ovárico) fue seccionada con un micro-cauterizador. El PN que acompaña a los vasos sanguíneos también se seccionó con un micro-cauterizador como se describe (Lara et al. 2002; Lara 1990). Las ratas se sacrificaron 21 días después de la cirugía. Todos los experimentos se realizaron 21 días después del procedimiento quirúrgico (cuando la NA ovárica es menor, (Lara et al. 2002)).

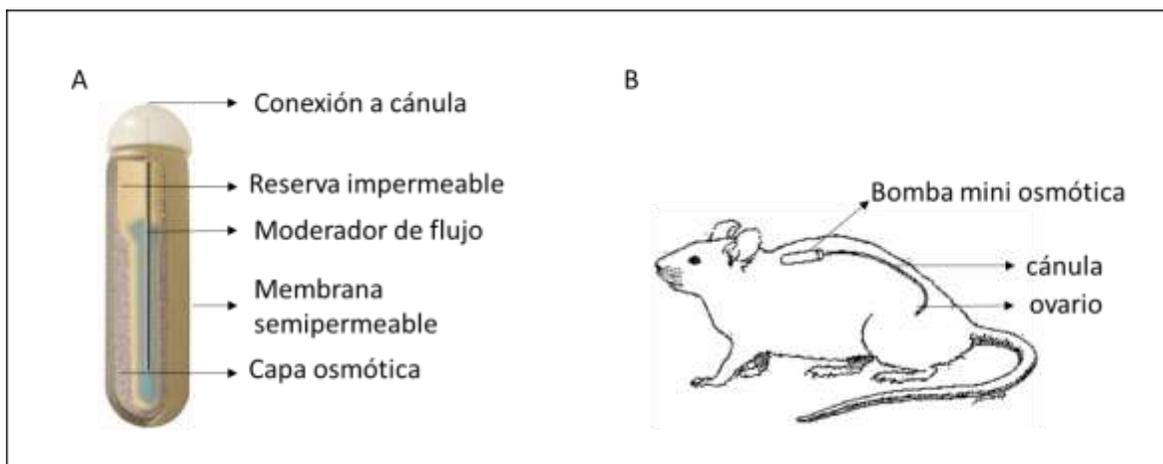
**3.3 Secreción de esteroides ováricos in vitro:** Se sacrificaron cinco ratas estresadas por frío y cinco de control y se extirparon ambos ovarios a través de una

incisión anterior en la línea media del abdomen. Los ovarios se dividieron por la mitad (2 ovarios = 4 mitades por animal), y cada mitad se incubó durante 3 h a 37°C en 1,0 mL de buffer Krebs-bicarbonato-albúmina (NaCl 118,6 mM; KCl 4,7 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM; ácido ascórbico 100 µg/ml; NaHCO<sub>3</sub> 0.15 M; CaCl<sub>2</sub> 25 mM; albúmina 0.1 mg/ml; glucosa 11.2 µg/ml) bajo 95% de oxígeno y 5% de CO<sub>2</sub>. Para cada rata, la mitad del ovario se incubó en buffer de bicarbonato de Krebs y el segundo se incubó con 100 µM adicionales de carbacol (Cch) como estímulo para los RM (número de catálogo 212385-M, Sigma Chemicals, St Louis, MO, EE. UU. ). La tercera mitad del ovario se incubó en buffer de bicarbonato de Krebs con 10 µM de atropina (At), un antagonista muscarínico (número de catálogo A0257-10g, Sigma Chemicals, St Louis, MO, EE. UU.), + 100 µM de Cch (Blohberger et al. 2015). Después de 3 h de incubación, los medios de incubación se recolectaron para medir la secreción basal e inducida de testosterona, progesterona y estradiol mediante el kit EIA, siguiendo las instrucciones del fabricante.

**3.4 Protocolo de estrés:** El estrés que se utilizó en este trabajo corresponde al estrés por frío, el cual es capaz de activar el eje simpático sin producir una activación en las vías de estrés mediadas por glucocorticoides (Dorfman et al. 2003; Pacak, Baffi, et al. 1998). Los animales fueron transportados en sus jaulas a una pieza a 4°C (grupo estrés) y a temperatura ambiente (grupo control), y se dejaron ahí por 3 horas diariamente, de lunes a viernes por 4 semanas u 8 semanas de acuerdo al objetivo.

**3.5 Administración intra-ovárica de NEC-1 y NSA:** La administración se realizó mediante la implantación de mini bombas osmóticas de acuerdo a lo descrito previamente por el Laboratorio de Neurobioquímica de la Universidad de Chile (Lara et al. 2000). En este procedimiento, las ratas fueron anestesiadas usando una mezcla de ketamina (69mg/kg) y xilasina (10mg/kg) administrada vía intraperitoneal. Hicimos una pequeña incisión (1 cm de largo) a través de la piel y localizamos la aponeurosis lumbar izquierda o derecha, separamos el músculo y obtuvimos acceso

al ovario. Ya sea en el grupo simulado o en el grupo experimental, se ligó un ovario (generalmente el ovario derecho) para aislarlo de los vasos sanguíneos y se diseccionó el ovario y se guardó para otros experimentos (ovariectomizados unilateralmente). En el ovario izquierdo expusimos la bursa e hicimos una incisión de microcirugía para insertar una cánula (SILASTIC 0,64 mm ID x 1,19 mm OD CAT 508-003; Dow Corning Corp, Midland, MI, EE. UU.) que proviene de la bomba mini-osmótica implantada debajo la piel (figura 6). La cánula se mantuvo adherida a la pared de la bursa con una gota de adhesivo quirúrgico (Histoacryl, B.Braun Surgical, S.A, Rubí, España) y suturas adheridas al cuerno uterino ipsilateral. Las bombas permanecen operativas durante 28 días (flujo: 2,5  $\mu$ l/h/28 días). Previamente fueron cargadas con 200 $\mu$ l de una solución de NEC-1 (catalog number 2263; Biovision Incorporated, Milpitas, CA 95035, US) en etanol 1‰ a una concentración de 20 $\mu$ M o con NSA (catalog number 5025; Tocris Bioscience, Bristol, BS11 9QD, UK) en DMSO1‰ a una concentración de 0,5 $\mu$ M.



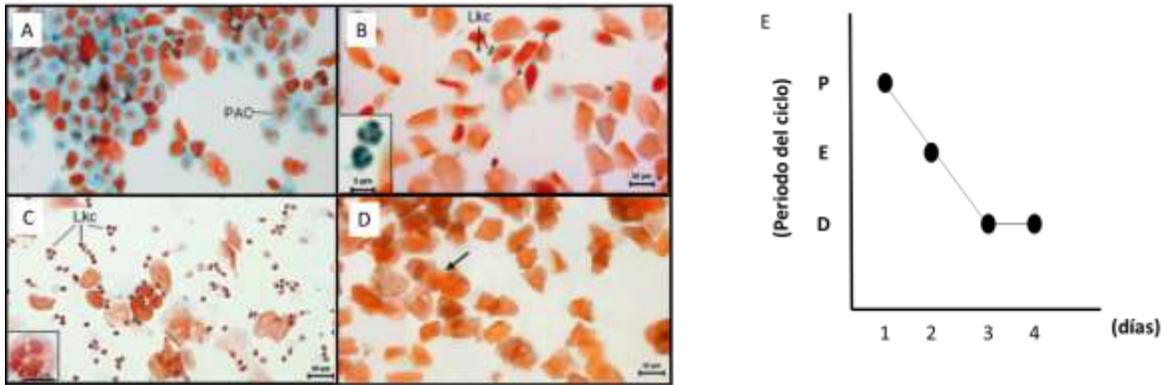
**Figura 6: Esquema bomba mini-osmótica.** Partes que componen mini bomba osmótica (A); Esquema de implantación de bomba miniosmótica. Modificado de la página de Alzet.

Durante la duración del tratamiento de las ratas, se les siguió la ciclicidad estral para verificar el correcto funcionamiento ovárico (Ricu et al. 2012).

**3.6 Estudios de administración de atropina in vivo:** se asignaron aleatoriamente dieciséis ratas hembra adultas a un grupo Control (Sham) (n=4), grupo de atropina

(n=4), estrés (n=4) y estrés+atropina (n=4). Los animales fueron anestesiados con un i.m. dosis de ketamina 60 mg/kg/xylazina 10 mg/kg solución en condiciones asépticas. Para eliminar la posible contribución del ovario contralateral a la esteroidogénesis, todos los animales Sham, estresados y tratados con atropina fueron ovariectomizados unilateralmente (ULO) en el momento del implante de la minibomba (Squicciarini et al. 2018). La implantación de mini-bomba se realizó como se informó previamente. A los animales del grupo de atropina se les implantaron mini-bombas osmóticas para la administración de atropina intra-ovárica a una concentración ovárica de 10 uM (número de catálogo 212385-M, Calbiochem, Sigma Chemicals, St Louis, MO, EE. UU.). Después de 28 días, se sacrificó a las ratas y se recogió la sangre del tronco y el ovario para su análisis. Los ovarios se fijaron con líquido de Bouin para el análisis morfométrico.

**3.7 Determinación del ciclo estral:** Ésta determinación permite relacionar rápidamente las características celulares del epitelio vaginal con el estado hormonal de la rata y permite seguir el ciclo estral y ovulatorio (C.C. Paccola 2013; Marcondes, Bianchi, and Tanno 2002). Se realizó mediante la observación al microscopio del tipo celular y la morfología presente en el frotis vaginal estableciendo así la etapa del ciclo en que se encuentra la rata (Marcondes, Bianchi, and Tanno 2002). El ciclo estral de la rata dura 4 días, de los cuales se distinguen 4 etapas: 1) Proestro: en esta etapa la vagina produce un engrosamiento epitelial, se observan en los frotis células epiteliales, muy pocos leucocitos y escasas células cornificadas (figura 7A); 2) Estro: se observa un predominio de células cornificadas y muy pocas células epiteliales (figura 7A); 3) Metaestro o Diestro I: disminuyen las células cornificadas y se observa la presencia de leucocitos (figura 7); 4) Diestro II: se observa abundancia de leucocitos y muy escasas células epiteliales (figura 7A). La presencia de ovulación se determinó por la correcta transición de las etapas del ciclo (Proestro, seguido necesariamente por un Estro y luego un Diestro) (figura 7B).



**Figura 7: Ciclicidad estral.** Proestro (A); diestro I (B); diestro II (C); estro (D); representación gráfica de un ciclo estral (E). Figura adaptada de Paccola et al 2013.

**3.8 Determinación de los niveles proteicos de MLKL, RIPK3, M5, M3 y M1:** Se realizó la detección de M1, M3 y M5 de ovario y el control interno de  $\beta$ -actina por Western blot, luego de la separación por SDS-PAGE en geles de poliácridamida al 10% en condiciones reductoras. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (tamaño de poro: 0,45  $\mu$ m; Schleicher & Schuell, Keene, NH, EE. UU.), se bloquearon con leche al 5 % durante 1 h y se probaron con anticuerpos primarios para anti- MLKL (sc-293201, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, Texas, USA) en una dilución de 1:1000 y anti- RIPK3 (sc-374639, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, Texas, USA) en una dilución de 1:1000 (Santa Cruz Biothechnology, Inc). En el caso de los receptores se utilizaron los anticuerpos primarios anti-M1 policlonales de conejo (AMR-001, Alomone Labs, Jerusalén, Israel) en una dilución 1:1000, anticuerpo policlonal de conejo anti-M5 (AMR-005, Alomone Labs) en una dilución 1:500, durante la noche o en una dilución 1:10,000 de anticuerpo monoclonal de ratón anti- $\beta$  -actina (A1978, Sigma–Aldrich Co.) durante 1h. Los complejos de anticuerpos se detectaron usando anticuerpo de cabra anti-conejo IgG Fc (HRP) (ab97200, Abcam, Inc.) o anticuerpo de caballo anti-ratón IgG Fc (HRP) (BA-2000, Vector Lab, CA, EE. UU.), ambos a 1:10.000, y para la quimioluminiscencia, se usó un kit de detección de quimioluminiscencia mejorado EZ-ECL (Biological Industries, KBH, Israel). La quimioluminiscencia se capturó utilizando un sistema G-Box Syngene (Syngene Headquarters, MD, EE. UU.). La intensidad de la banda se cuantificó mediante el software ImageJ (Rasband, 1997–2014) y los valores

obtenidos se normalizaron a  $\beta$ -actina. Cada detección de muestra de proteína se evaluó en tres experimentos independientes.

**3.9 Análisis Morfológicos:** Se cuantificaron y midieron la cantidad de folículos secundarios, folículos antrales, estructuras quísticas y cuerpos lúteos, de acuerdo al criterio de clasificación descrito por Lara (Lara et al. 2000), que se basa en la presencia, características y disposición de las células de la Teca y Granulosa. Los ovarios fueron fijados en solución Bouins, incluidos en un bloque de parafina sólida y se realizaron cortes de 6  $\mu$ m y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Se realizó la caracterización folicular de acuerdo a los siguientes criterios: 1) Folículos antrales: constan de una cavidad antral, células de granulosa y teca ordenadas con una membrana basal que las separa, además de células de la granulosa en división y en contacto con un ovocito saludable; 2) Folículos atrésicos: presentan más del 5% de células de granulosa con núcleos picnóticos, hipertecosis o granulosa desensamblada y con un ovocito no saludable o ausente, como también irrupciones de la membrana basal; 3) Cuerpos Lúteos: el folículo ha ovulado y las células de la teca y granulosa padecen hipertrofia celular, se luteinizan y se evidencia vascularización; 4) Estructuras quísticas: 4.1) Folículos tipo III: estructuras de gran tamaño, con la teca hipertrofiada e invaginada a la capa de granulosa y contienen aún el ovocito, 4.2) Quistes: contienen escasa presencia o ausencia de células de la granulosa, teca hipertrofiada y un antro de gran tamaño con líquido y sin ovocito.

**3.10 Inmunohistoquímica para MLKL y BAX:** Los ovarios fijados fueron deparafinados y rehidratados en una batería de alcoholes. Se realizó la recuperación antigénica en buffer citrato 10mM a pH 6 calentados por vapor a 100°C por 30 minutos. El bloqueo de la peroxidasa endógena será realizado con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% en metanol por 20 minutos a temperatura ambiente en la cámara húmeda. Para el bloqueo inespecífico se incubarán las muestras en suero de cabra o de equino al 5% en PBS1x por 30 minutos para posteriormente incubar con los anticuerpos primarios durante toda la noche. Se usó anticuerpo anti-MLKL (sc-

293201, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, Texas, USA) a una concentración de 1:1000 y anticuerpo anti BAX (ab32503, Abcam plc.) a una concentración de 1:1000. Luego de los lavados con se incubó con el anticuerpo secundario por 1 hora, para luego incubarlo por una hora con estreptavidina peroxidasa 1ug/ml. Finalmente se revela con DAB (SIGMAFAST™ DAB with Metal Enhancer Tablet Set, SIGMA, Saint Louis Missouri, USA) (Blohberger et al. 2015).

**3.11 Inmunohistoquímica de los receptores M1, M3 y M5:** La inmunohistoquímica (IHC) se realizó en cortes de 6 µm de ovarios de rata fijados e incluidos en parafina, como se describió previamente (Squicciarini et al. 2018; Riquelme et al. 2019). La recuperación del antígeno se realizó en microondas durante 10 minutos en tampón TRIS-EDTA pH 9,0, y luego la muestra se lavó 3 veces en PBS. Las muestras se incubaron durante 30 minutos en peróxido de hidrógeno al 3 % con metanol al 10 % para bloquear las peroxidases endógenas. Los anticuerpos utilizados fueron anticuerpo anti-M1 policlonal de conejo (AMR-001, Alomone Labs, Jerusalén, Israel) en una dilución 1:1000, anticuerpo anti-M5 policlonal de conejo (AMR-005, Alomone Labs, Jerusalén, Israel) en una dilución de 1 :1000 dilución y anticuerpo policlonal de conejo anti-M3 (AMR-006, Alomone Labs, Jerusalén, Israel) a dilución 1:800, añadiendo un paso de permeabilización con 10% Triton X100 para inmunotinción M1 y M3 antes de la recuperación del antígeno. Las incubaciones de anticuerpos se realizaron durante la noche en PBS complementado con suero de caballo normal al 5%. El segundo día, los cortes se lavaron en PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado (1:200) durante 1 h. La señal se detectó utilizando el kit Vectastain ABC (VectorLabs, Burlingame, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La preadsorción se realizó como se describe previamente en las instrucciones del fabricante.

**3.12 Estudios PCR:** El ARN se extrajo por el método descrito por Chomczynski y Sacchi del medio ovario (control y estrés). Para la síntesis de la primera cadena de ADNc, usamos SUPERSRIPT II (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.; 200 unidades)

en un volumen de reacción de 20 µL. con 1 µg de RNA total. Los partidores utilizados fueron del trabajo publicado de (Iismaa et al. 2000) y se realizó un análisis BLAST para determinar su especificidad de las secuencias. Las secuencias de los partidores para PCR en tiempo real son M1: F 5'-TCTGAGACACCAGGCAAAGG-3' y R 5'-CTTGACTGTATTTGGGGAGC-3' (gene blast M16406), M3: F 5'-ACAGGCAGTTCTCGAAGCT-3' y R 5'-ACGGTAGCTTGGTAGAG-3' (gene blast M16407) y M5: F 5'- AAACAGTTGTGAACACCCG-3' y R 5'-CTCTTTTGACCAGAACCATTC-3' (gen blast M22926).

La mezcla de reacción de PCR contenía 10 µL de Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, Inc., California, EE. UU.); 0,25 µM de cada partidor GAPDH, 0,1 µM de cada partidor MR, 2 µL de ADNc y agua estéril para un volumen final de 20 µL. Las reacciones de PCR se realizaron utilizando el termociclador en tiempo real IQ5 (BioRad) en las siguientes condiciones: 94 °C durante 20 s, 60 °C durante 20 s para MR (60 °C para GAPDH), 78 °C durante 20 s y una extensión final de 72°C por 10 min. Todas las muestras para el análisis de RT-qPCR se analizaron por triplicado y se utilizó un valor medio para la determinación de los niveles de ARNm. La cuantificación relativa de los niveles de ARNm de MR se realizó utilizando la relación entre los niveles de ARNm de MR y GAPDH.

### **3.13 Determinación de Noradrenalina (NE) y Acetilcolina (ACh):**

a.- La cuantificación de los niveles de NE se realizó mediante el kit ELISA competitivo de norepinefrina-Research® (IMMUSMOL, Pessac, Francia), según las instrucciones del fabricante. La NE se extrajo mediante gel de afinidad, se realizó acilación de la NE y luego se derivatizó enzimáticamente. El antígeno se unió a la fase sólida de la placa de microtitulación. Los estándares, controles y muestras derivatizados, así como el analito unido a la fase sólida, compitieron por un número fijo de sitios de unión al antisuero. El anticuerpo unido a la fase sólida se detectó utilizando un conjugado de peroxidasa IgG anti-conejo y tetrametilbencidina (TMB) como sustrato. La reacción se controla a 450 nm. La sensibilidad fue de 2 pg/ml y la variabilidad intra e interensayo fue del 8,4 % y el 8,0 %, respectivamente. La

reactividad cruzada encontrada fue del 0,14 % para la adrenalina y del 1,8 % para la dopamina.

b.- En cuanto a la determinación de ACh, se homogeneizó el ovario en 10 volúmenes de PBS en hielo. La ACh se determinó en el homogeneizado utilizando el kit de ensayo Amplex® ACh/AChE (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones recomendadas por el proveedor, como se describió anteriormente (18,34). Los resultados representan la cantidad total de ACh en  $\mu\text{mol}$  por ovario. El valor mínimo detectable de ACh fue de 0,3  $\mu\text{M}$  (rango, 0,3  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ ).

**3.14 Mediciones de hormonas esteroidales:** Las hormonas esteroidales liberadas al medio durante la incubación de los ovarios con agonistas y/o antagonistas colinérgicos y las concentraciones séricas de las hormonas esteroidales testosterona, estradiol (E2) y progesterona (P4) se determinaron mediante EIA, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los números de catálogo de los kits de prueba fueron 11-TESHU-E01, 11-ESTHU-E01 y 11-PROHU-E01 para testosterona, E2 y P4, respectivamente (Alpco Diagnostic). Las variaciones intraensayo e interensayo fueron inferiores al 5 % para E2, inferiores al 6 % para testosterona y inferiores al 5 % para P4. Los valores mínimos detectables fueron 10, 0,02 y 0,1 ng/ml, respectivamente.

**3.15 Tamaño muestral:** Para los experimentos se consideró un  $n=6$  para cada una de las edades, exceptuando el grupo NSA cuyo  $n$  fue menor por el contexto pandemia. Este tamaño muestral fue determinado de acuerdo a la fórmula de Taucher:  $N=2x(Z\alpha/2 + Z\beta)^2 \times s^2/D^2$ , donde  $Z\alpha$  corresponde a la probabilidad de cometer un error tipo I (5%) y  $Z\beta$  a la probabilidad de cometer error tipo II (20%), con un nivel de significación mínima de 0.05.

**3.16 Análisis Estadísticos:** Las diferencias entre los distintos grupos experimentales fueron analizados usando el *test de student* para datos pareados. Para el análisis de grupos independientes se utilizó ANOVA seguido de un post-test

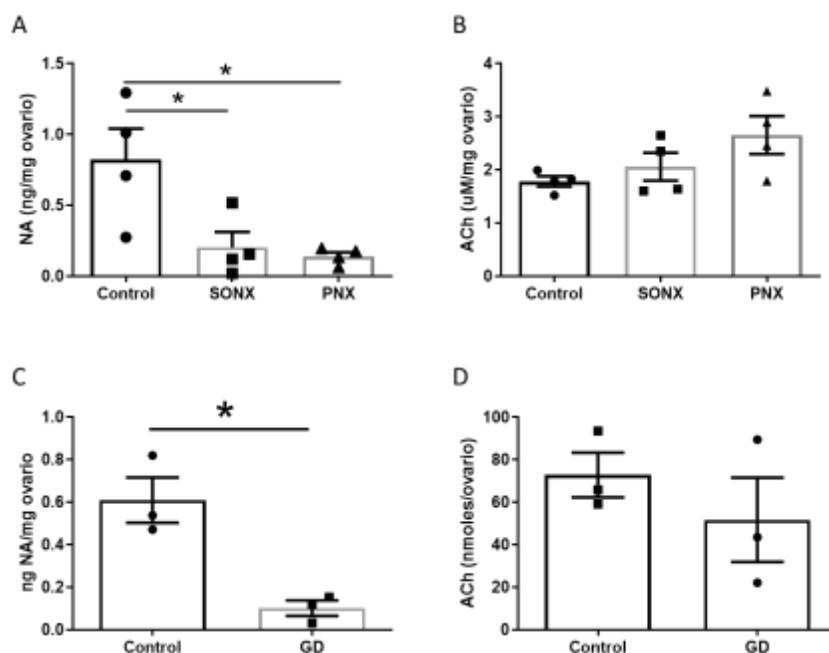
para comparaciones múltiples por el Newman-Keulss. Se consideró diferencias significativas con un valor de  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados

### Objetivo 1:

#### 1.1 Estudio de la inervación colinérgica ovárica.

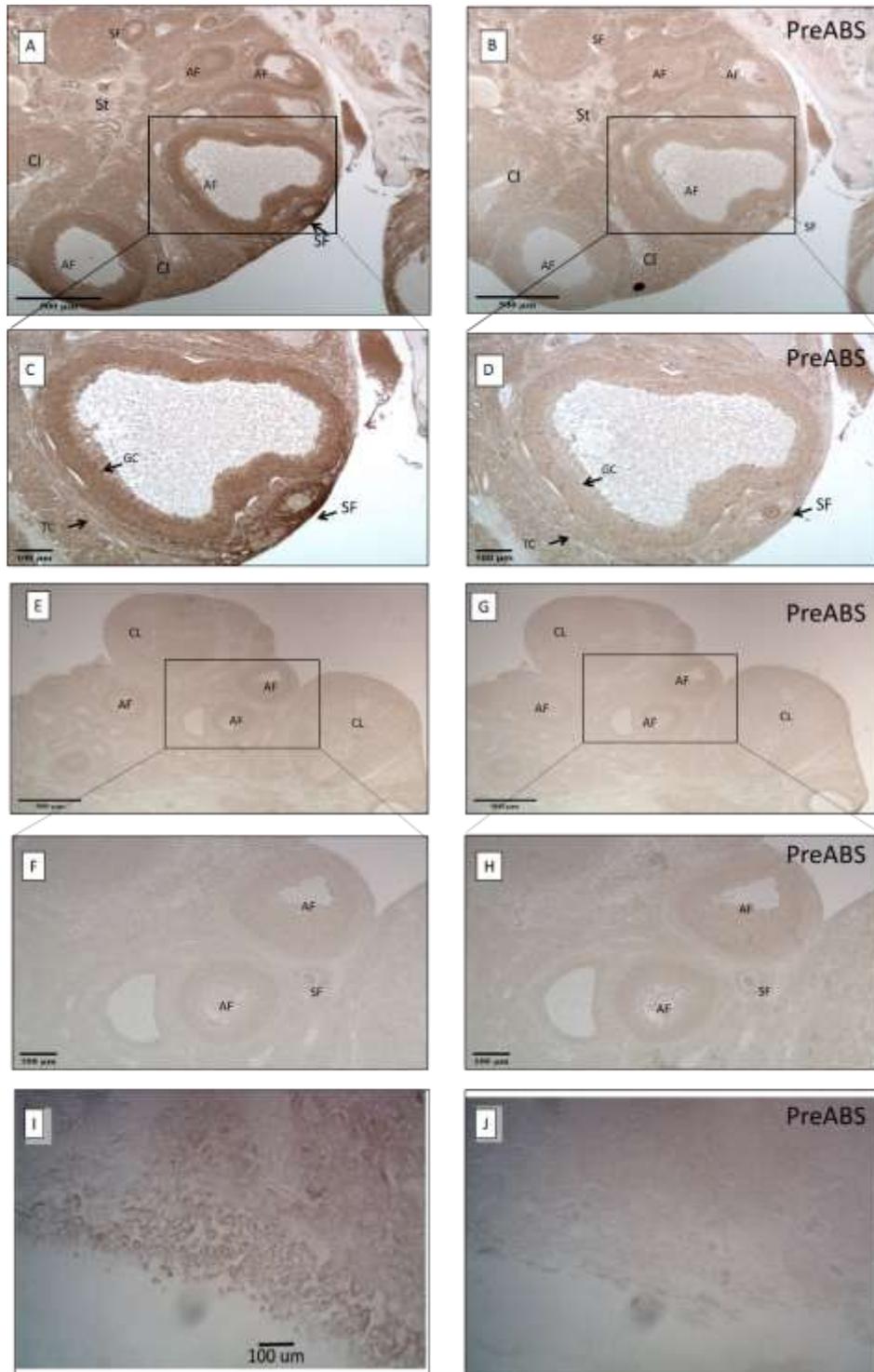
Para este objetivo se realizaron dos tipos de denervaciones, quirúrgica o química. La denervación quirúrgica fue realizada sobre el nervio ovárico superior o del plexo nervioso y se evaluaron los niveles intra-ováricos de NA y ACh. La Figura 8 muestra los resultados después de la sección quirúrgica del SON o NP en los niveles de ACh y NA ováricos (después de 21 días). NA disminuyó en ambos procedimientos, pero los niveles ováricos de ACh no disminuyeron significativamente (Figura 8A). Se encontró un resultado similar después del tratamiento con GD, es decir, una disminución del 90% en NA pero ninguna diferencia significativa en ACh (Figura 8B).



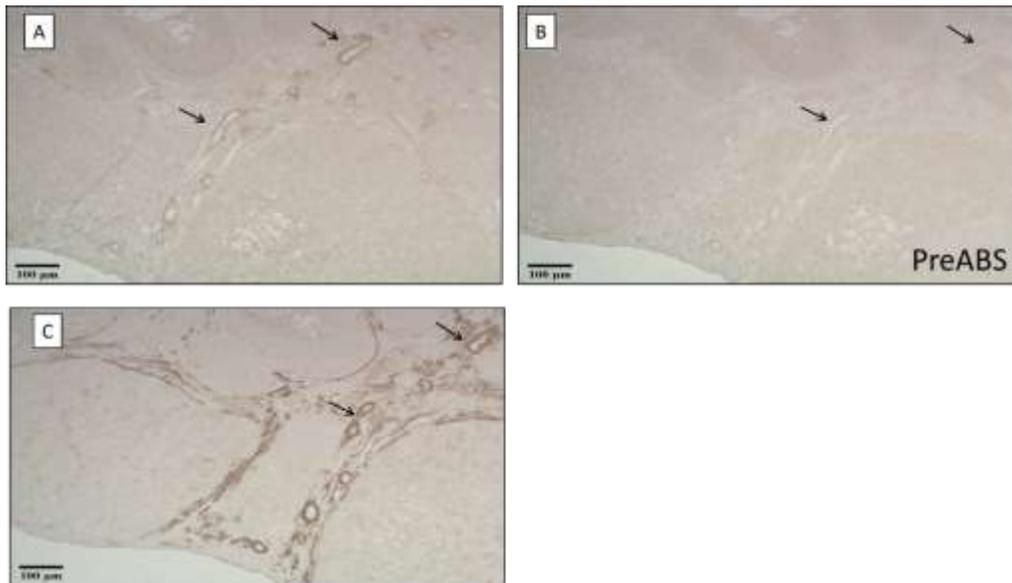
**Figura 8:** El efecto de la denervación quirúrgica del nervio ovárico superior (SONX) o del plexo ovárico (PNX) sobre la concentración de noradrenalina (NA) o acetilcolina (ACh) en el ovario (A y B). El efecto del tratamiento neonatal con guanetidina (GD) sobre ambos neurotransmisores (C y D). C y D corresponden a resultados obtenidos por Agustín Benítez. Los resultados se expresan como media ± S.E.M. (n=3 para cada grupo).

## **1.2 Distribución intra-ovárica de los receptores muscarínicos**

Para este objetivo se realizaron inmunohistoquímicas en secciones de ovario de rata con los distintos anticuerpos para cada receptor y con sus respectivo péptido de bloqueo como control. Se observó marca positiva para los receptores M1 en GC de folículos pre-ovulatorios y una fuerte señal específica en folículos secundarios (FS) (Figura 9A, 9C). También se detectó marca en las células de la teca y el cuerpo lúteo, pero la intensidad fue menor que en las estructuras pre-ovulatorias (Figura 9A, 9C). También se usó hipocampo de rata como control positivo (Figura 9 I, J). La Inmunohistoquímica para M3 en el ovario, por el contrario, no fue detectable (Figura 9E-H). Por su parte, la marca de M5 se observó exclusivamente en estructuras pequeñas y redondas localizadas en la región del estroma del ovario (Figura 10A-10B), lo que morfológicamente se asemejaba a vasos. Para corroborar si estos correspondían a vasos sanguíneos se usó también el anticuerpo  $\alpha$ -actina del músculo liso ( $\alpha$ SMA) (Fig. 10C), que marca las células del músculo liso vascular de los vasos sanguíneos. La marca de  $\alpha$ SMA dio positivo para las mismas estructuras observadas con el anticuerpo para M5, sugiriendo que M5 estaría presente en los vasos.



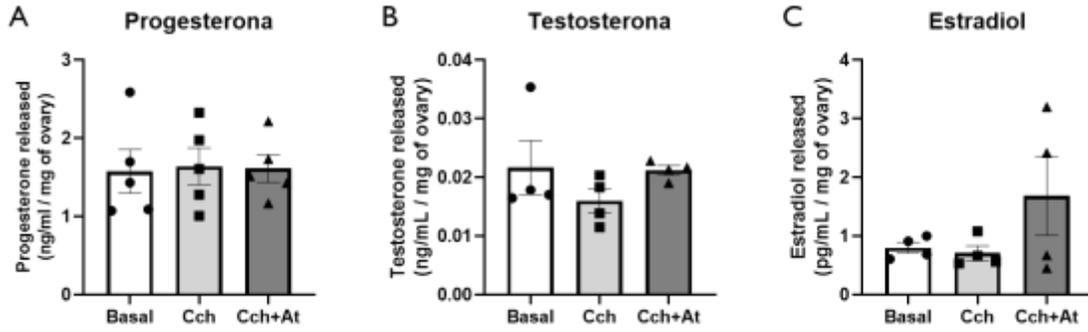
**Figura 9: Detección inmunohistoquímica de receptores M1 y M3 en ovario de rata.** M1 se detecta principalmente en folículos antrales y preovulatorios, pero también está presente en folículos más pequeños (A: 10x, C: 40x). No se detecta M3 en ninguna estructura ovárica (E: 10x, G: 40x). Las figuras de anticuerpos preadsorbidos (PreABS) de M1 (B: 10x, D: 40x) y M3 (F: 10x, H: 40x) se muestran como control negativo. (CL: cuerpos lúteos, AF: folículo antral, SF: folículo secundario). (I) es un control positivo para M1R, neuronas en hipocampo de rata y (J) es el control negativo (sin anticuerpo primario) para (I)



**Figura 10: Detección inmunohistoquímica del receptor M5 en el ovario de rata.** M5 se detecta en pequeños vasos sanguíneos (flechas) (A). Como control positivo de vasos sanguíneos utilizamos un anticuerpo de actina anti- $\alpha$ SMA (flechas) (C). El anticuerpo preadsorbido (PreABS) de M5 (B) se muestra como control negativo.

### 1.3 Activación de los receptores y síntesis de esteroides

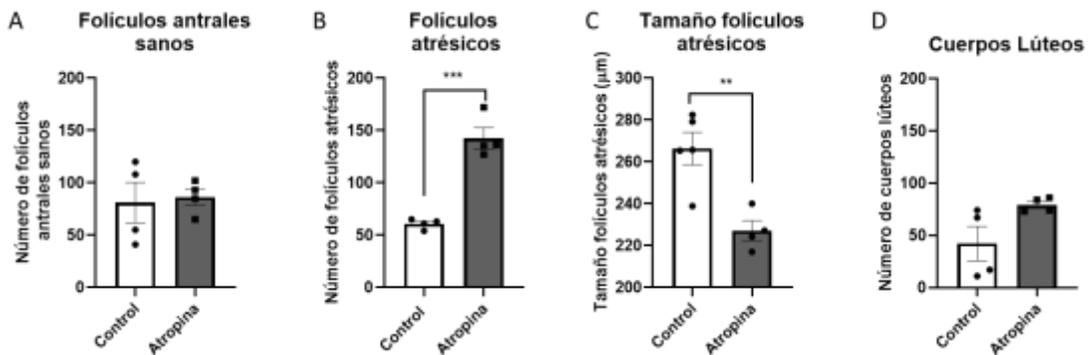
Con el objetivo de evaluar el rol de los receptores muscarínicos en la secreción de hormonas esteroidales se incubaron medios ovarianos provenientes de animales controles. Estos se incubaron en buffer Krebs con agonistas (carbacol) y antagonistas (atropina) de los receptores muscarínicos. Se observó que al estimular los receptores con agonista muscarínico no se observan cambios en la secreción de ninguno de los esteroides analizados (figura 11 A, B y C). Cuando se realizó la co-incubación con el antagonista tampoco se observaron cambios significativos en la secreción de esteroides. (Figura 11 A, B y C).



**Figura 11: Secreción ex vivo de hormonas esteroidales.** Acumulación de T (A), E2 (B) y P4 en medio en condiciones basales, después de la adición de carbacol (100  $\mu$ M) o carbacol (100  $\mu$ M) y atropina (10  $\mu$ M). Los ovarios de cada rata se dividieron y se incubaron durante 3 h para medir la secreción de esteroides. Los grupos corresponden a control y estrés (n = 5); media  $\pm$  S.E.M

#### 1.4 Efecto de la inhibición de los receptores en el desarrollo folicular

Como se ha descrito anteriormente, existen evidencias que apuntan a que la estimulación colinérgica conduce a una promoción del desarrollo folicular, sin embargo, no está del todo esclarecido mediante que receptores ejercería esta función. En esta línea, nosotros quisimos analizar los efectos que provoca la administración de un antagonista muscarínico en el desarrollo folicular. Los resultados obtenidos indican que el bloqueo de los receptores muscarínicos no genera cambios en el número de folículos antrales sanos ni de cuerpos lúteos (Figura 12 A y D). Sin embargo, aumenta el número de folículos atrésicos y estos serían más pequeños en comparación al control (Figura 12 B y C).



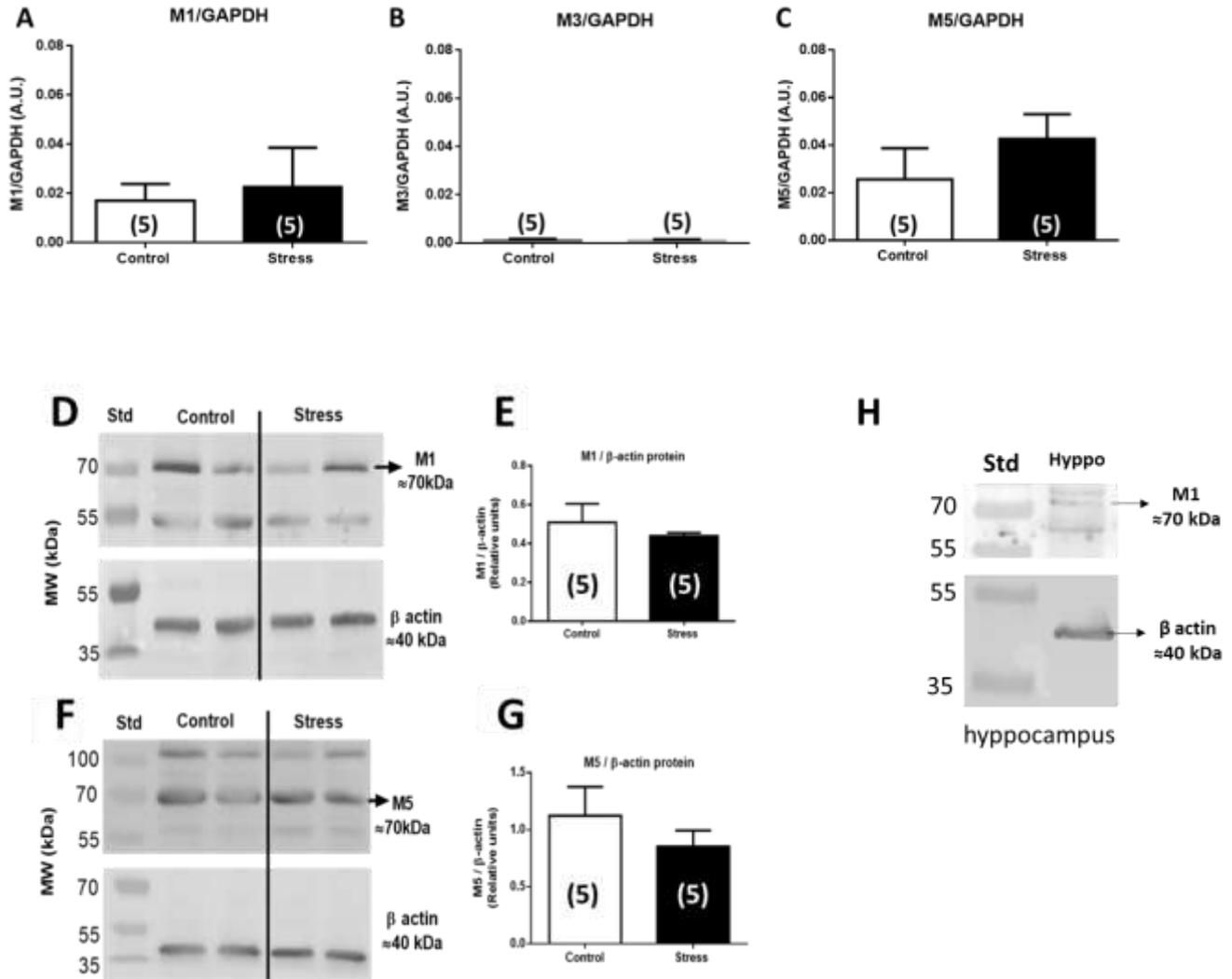
**Figura 12: Administración intra-ovárica in vivo de atropina.** Los animales de control (Control) fueron expuestos a cirugía simulada; en el grupo de Atropina (Atropina), los animales fueron expuestos a 100  $\mu$ M de Atropina administrada localmente al ovario por medio de una minibomba osmótica. El número de folículos antrales sanos se da en (A), el número de folículos antrales

atrésicos en (B). En (C), se muestra el tamaño medio de los folículos atrésicos. (D) representa el número de cuerpos lúteos (CL). Los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM de n = 4 animales, como se muestra en la figura. \*\*P < 0,01, \*P < 0,05, prueba t de Student no pareada.

## **Objetivo 2.**

### **2.1 Efecto del estrés en los receptores muscarínicos en ovario**

Datos anteriores describieron un aumento en la concentración de ACh en el ovario de ratas expuestas a estrés simpático, es decir, cuando las ratas estuvieron expuestas a estrés por frío crónico durante 28 días (Riquelme et al. 2019). Los resultados de las mediciones de los niveles de ARNm (figura 13 A-C) y proteína de los receptores M1, M3 y M5 (13 D-E) mediante RT-qPCR y western blot, respectivamente, en muestras de ovario de ratas control y estresadas. El hipocampo de rata sirvió como control positivo. Como era de esperar por los resultados de los análisis de inmunohistoquímica, el subtipo M3 no fue detectable por análisis de Western blot (datos no mostrados). Se encontró mensajero de M1 y M5 en el ovario y las proteínas correspondientes. Respecto a la condición estrés, ni los niveles de mensajero ni de proteínas cambiaron en el ovario de ratas expuestas a estrés por frío crónico durante 28 días.



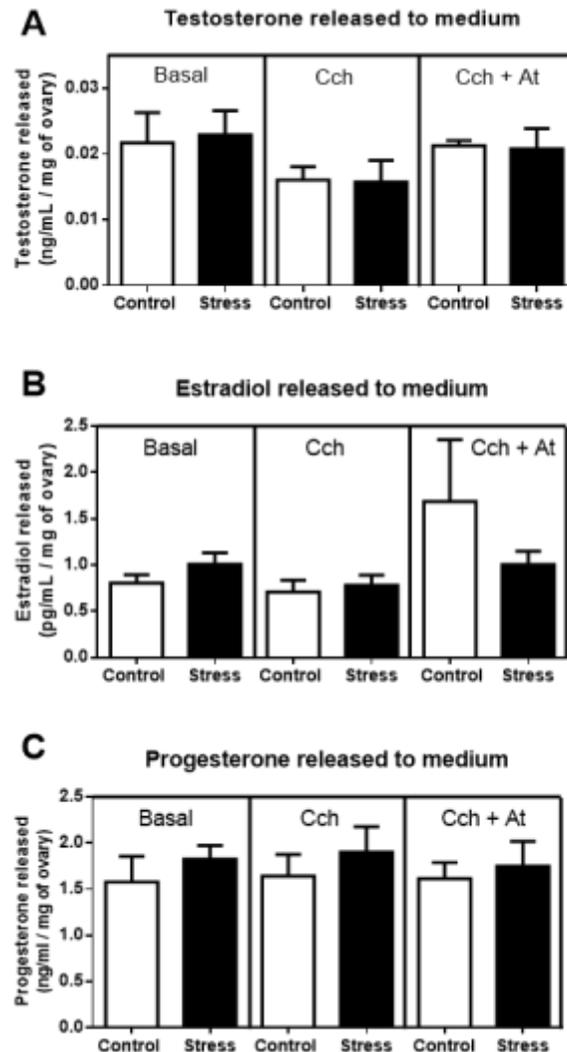
**Figura 13: Niveles de mensajero y proteicos de los receptores muscarínicos durante estrés.** Los de mensajero de M1 (A), M3 (B) y M5 (C) normalizada con los niveles de mensajero de GAPDH. D, E, E, F muestran los resultados del análisis de Western blot. Se muestran membranas representativas de M1 (D) y M5 (F). El gráfico de barras muestra la cuantificación de los niveles de proteína de M1 (D) y M5 (F) en comparación con el control  $\beta$ -actina en cada condición. Para M3 no encontramos señales ni en condiciones de control ni de estrés. (H) Se utilizó una muestra de tejido del hipocampo como control positivo. Los píxeles se contaron utilizando el software ImageJ. Los resultados se expresan como las medias  $\pm$  S.E.M. (n=5 para cada grupo).

## 2.2 Activación muscarínica sobre la secreción de esteroides en ovarios control y estrés

Para analizar el rol de la ACh sobre los receptores muscarínicos en la esteroidogénesis, y excluir cualquier contribución sistémica a este proceso, realizamos incubaciones de corta duración (3 horas) con ovarios aislados de animales control y estresados por frío en

presencia de carbacol (agonista muscarínico) con o sin atropina (antagonista muscarínico). Se midieron los niveles de testosterona (T), estradiol (E2) y progesterona (P4) liberados a los medios de incubación. No detectamos ningún cambio significativo entre los ovarios del control y los animales estresados in vivo (Figura 14).

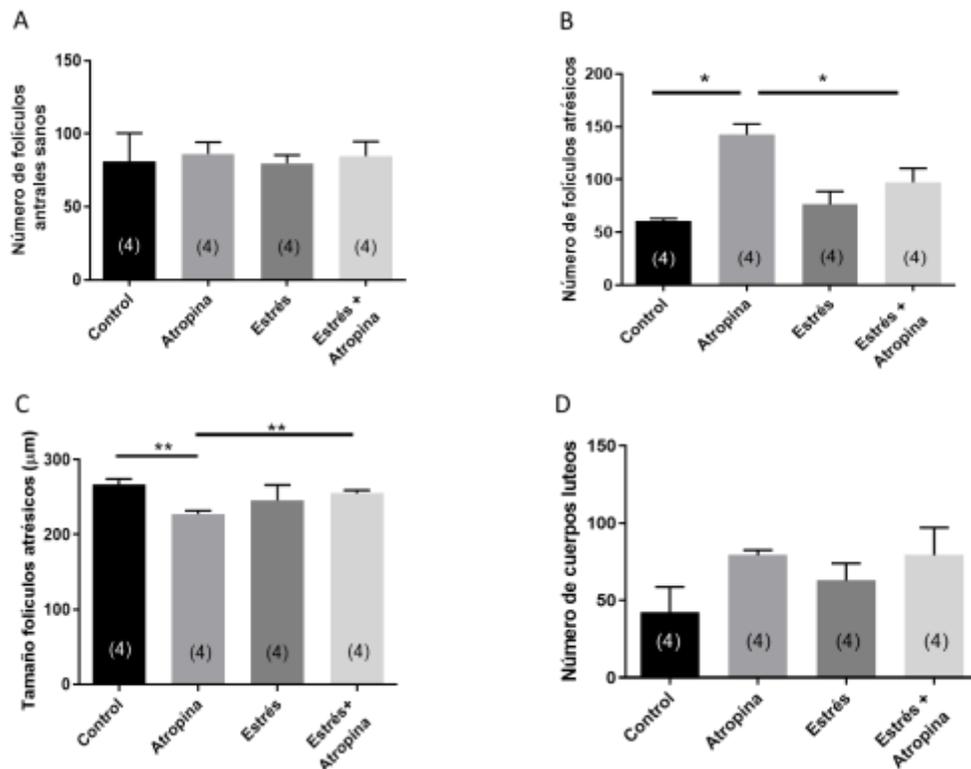
Cuando incubamos ovarios de ratas control o 28 días estresadas por frío con carbacol y/o atropina, no pudimos detectar cambios con respecto a la condición basal (Figura 14).



**Figura 14: Mediciones de esteroides en medios.** Acumulación de T (A), E2 (B) y P4 en medio en condiciones basales, después de la adición de carbacol (100  $\mu$ M) o carbacol (100  $\mu$ M) y atropina (10  $\mu$ M). Los ovarios de cada rata se dividieron y se incubaron durante 3 h para medir la secreción de esteroides. Los grupos corresponden a control y estrés (n = 5); significa  $\pm$  S.E.M.

### 2.3 Efecto del bloqueo de los receptores muscarínicos sobre el desarrollo folicular del ovario de ratas control y estrés.

A las muestras de animales después de la aplicación crónica de atropina bajo control y condiciones de estrés por frío, se le evaluó los cambios en la morfología ovárica. No se encontró ningún efecto de la atropina sobre el número de folículos antrales sanos, ni en los controles ni después de 28 días de estrés por frío (Fig. 15A). Sin embargo, la aplicación de atropina aumentó significativamente la atresia de los folículos antrales, especialmente en condiciones de control y, en parte, en condiciones de estrés (Fig. 15B). El tratamiento con atropina resultó además en una disminución significativa del tamaño de los pequeños folículos antrales atrésicos (Fig. 15C y D). No hubo cambios significativos en el número de cuerpos lúteos.



**Figura 15: Análisis morfométrico de los ovarios después de la exposición intrabursal *in vivo* con atropina 100 µM durante 28 días.** Los animales de control (Control) fueron expuestos a cirugía simulada; en el grupo de Atropina (Atropina), los animales fueron expuestos a 100 µM de Atropina administrada localmente al ovario por medio de una minibomba osmótica. En el grupo de estrés (estrés), los animales fueron expuestos a estrés por frío durante 28 días y en otro grupo (estrés + atropina), los animales fueron expuestos a estrés y recibieron atropina durante 28 días. El número de folículos antrales sanos se da en (A), el número de folículos antrales atrésicos en (B). En (C), se muestra el tamaño medio de los folículos antrales y (D), la distribución del tamaño de los folículos atrésicos. (E) representa el número de cuerpos lúteos (CL). Los valores corresponden a la

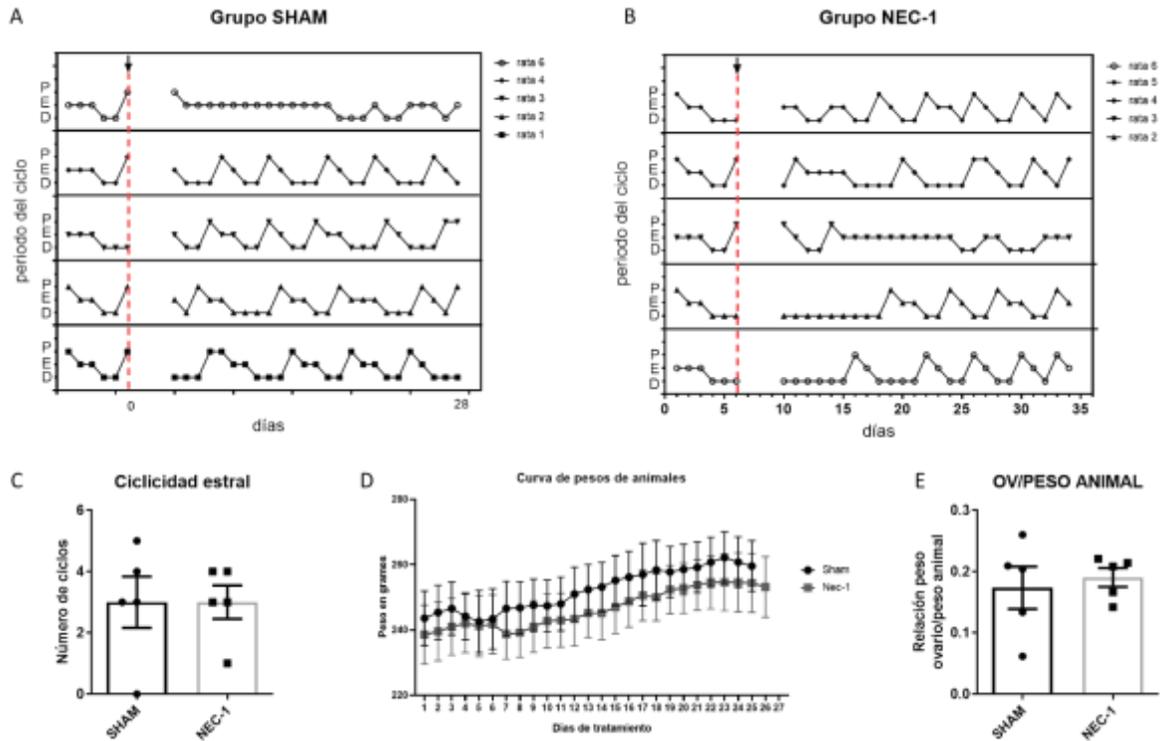
media  $\pm$  SEM de n = 4 animales, como se muestra en la figura. \*\*P < 0,01, \*P < 0,05, prueba t de *Student* no pareada.

### **Objetivo 3**

#### **3.1 Evaluación de los efectos a la exposición intrabursal crónica de NEC-1 en la función ovárica.**

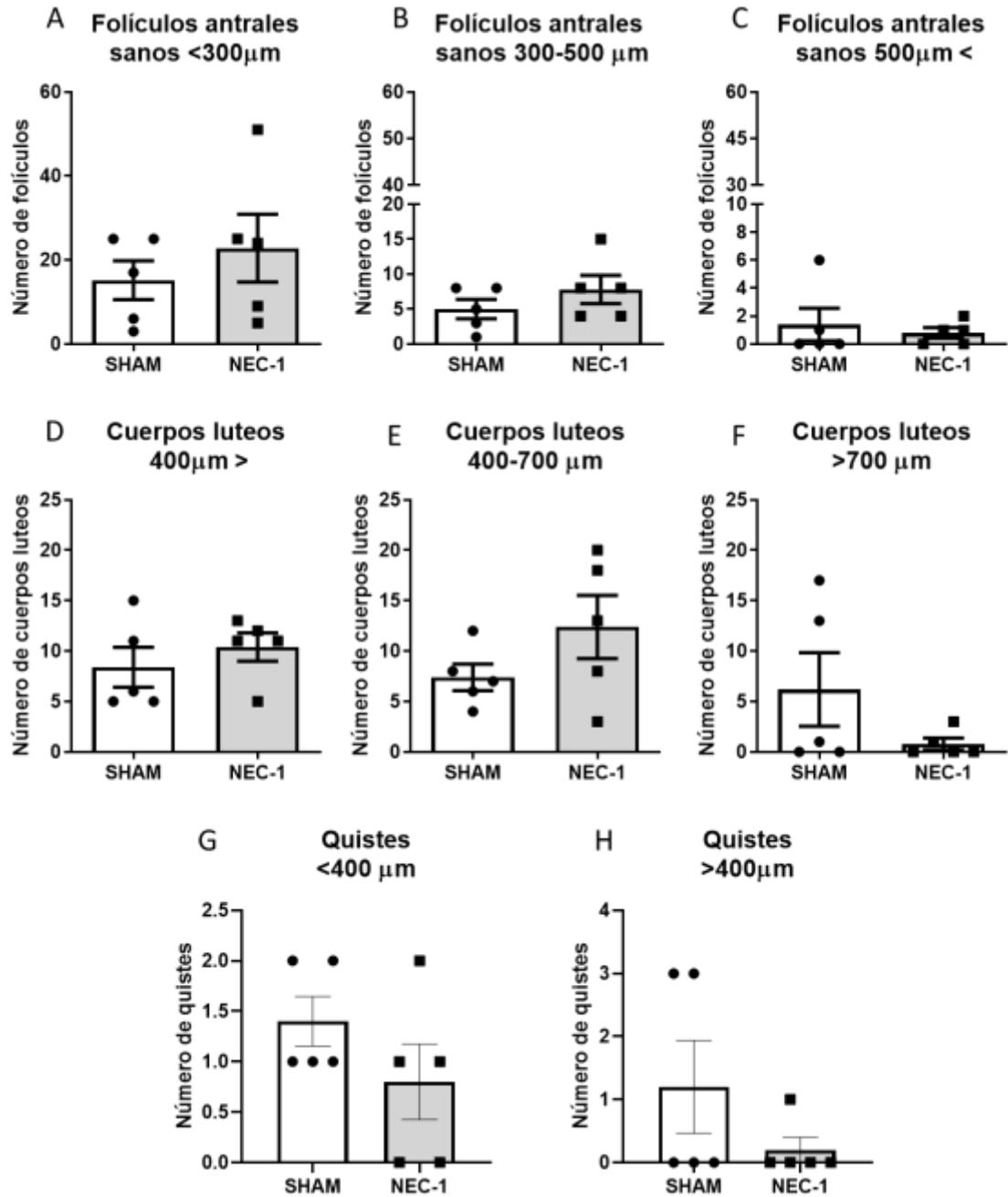
Para evaluar la función ovárica de los animales, uno de los parámetros medidos fue la ciclicidad estral, dado que este refleja dos fenómenos importantes de la fisiología ovárica como lo son el desarrollo folicular que llevan a la ovulación y en la síntesis de esteroides ováricos (Marcondes, Bianchi, and Tanno 2002). Se realizaron registros diarios de las etapas del ciclo estral en que se encontraban las ratas, desde el inicio del tratamiento hasta el día de la eutanasia. No se observaron cambios significativos en el número de ciclos ovulatorios entre el grupo sham y tratado con NEC-1 (fig. 16A, B y C). Junto a esto, y con el objetivo de corroborar que el tratamiento no haya sido perjudicial para el animal se compararon los registros de pesos diarios entre ambos grupos (fig. 16D). No aparecieron diferencias y más aún, en ambos casos se ve un aumento progresivo del peso como es de esperar en animales correspondientes a 3 meses de edad.

El tratamiento con NEC-1 no afectó el peso de los ovarios ni su relación peso ovario y peso animal (figura 16D). Todos estos parámetros evaluados nos indicarían que el tratamiento no fue perjudicial para el animal, y el tratamiento de 28 días no fue capaz de modificar significativamente el número de ciclos de los animales en estudio.

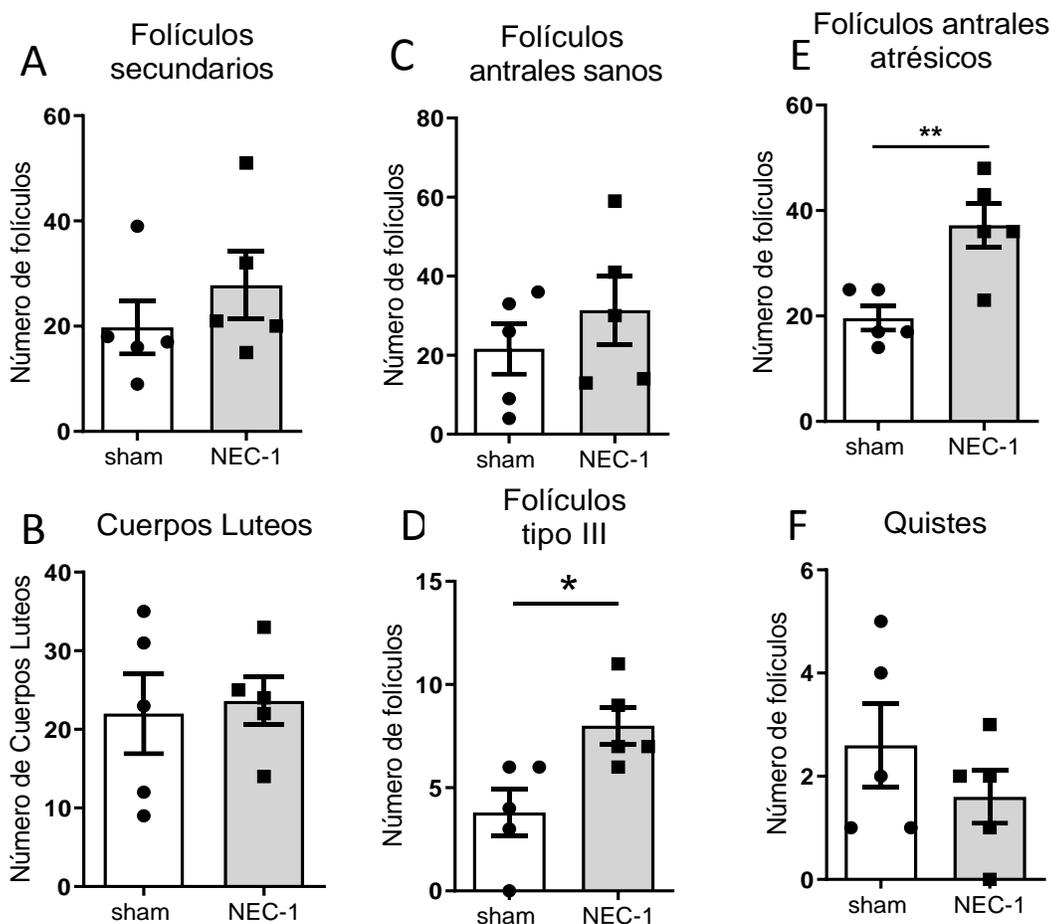


**Figura 16: Efectos generales de la administración de NEC-1.** (A) y (B) Diagrama de ciclicidad estral de animales sham y tratados con NEC-1 respectivamente; Se grafica como P=proestro, E=estro y D=diestro 1 y diestro 2. La ciclicidad se evaluó mediante frotis vaginal diario y observación al microscopio. La línea segmentada indica el día de inicio del tratamiento. (C) Número de ciclos, un ciclo estral normal se considera como el paso de P a E, seguido necesariamente por un D. Se graficaron como el promedio  $\pm$ SEM. (D) Curva de Peso de animales, se graficó el promedio  $\pm$ SEM de los pesos registrados diariamente de los animales sham y NEC-1 durante el periodo de tratamiento. (E) Relación Peso ovario y peso animal.

La exposición del ovario a NEC-1 modificó el desarrollo folicular del ovario. Se trabajó con una ventana temporal de 28 días de exposición a NEC-1, tiempo necesario para afectar a una cohorte completa de folículos que tardan entre 21 y 28 días en la rata (McGee and Hsueh 2000). Durante este periodo de tratamiento no se encontraron cambios en el número de folículos secundarios y folículos antrales sanos después de la exposición a NEC-1, como tampoco cambios en el número de cuerpos lúteos (Fig. 17A, B y C). Tampoco se observaron cambios en la distribución de tamaños de estas estructuras (Figura 17 A, B, C, D, E y F). Sin embargo, el número total de folículos antrales atrésicos se vio afectado, aumentando en número en comparación con el control sham (Fig. 18 E).



**Figura 17: Efecto de NEC-1 sobre el tamaño de los folículos antrales sanos, cuerpos lúteos y quistes en ovario de rata.** (A), (B) y (C) Folículos antrales sanos de tamaños <300 µm; 300-500 µm y >500 µm respectivamente; (D), (E) y (F) Cuerpos lúteos de tamaños <400 µm, 400-700 µm y >700 µm respectivamente; (G) y (H) Quistes de tamaños <400 µm; y >400 µm respectivamente. Los grupos corresponden al tratamiento simulado y NEC-1; todos los valores corresponden a la media ± SEM. N=5. p<0,05 \*, t-test o Mann-Whitney test

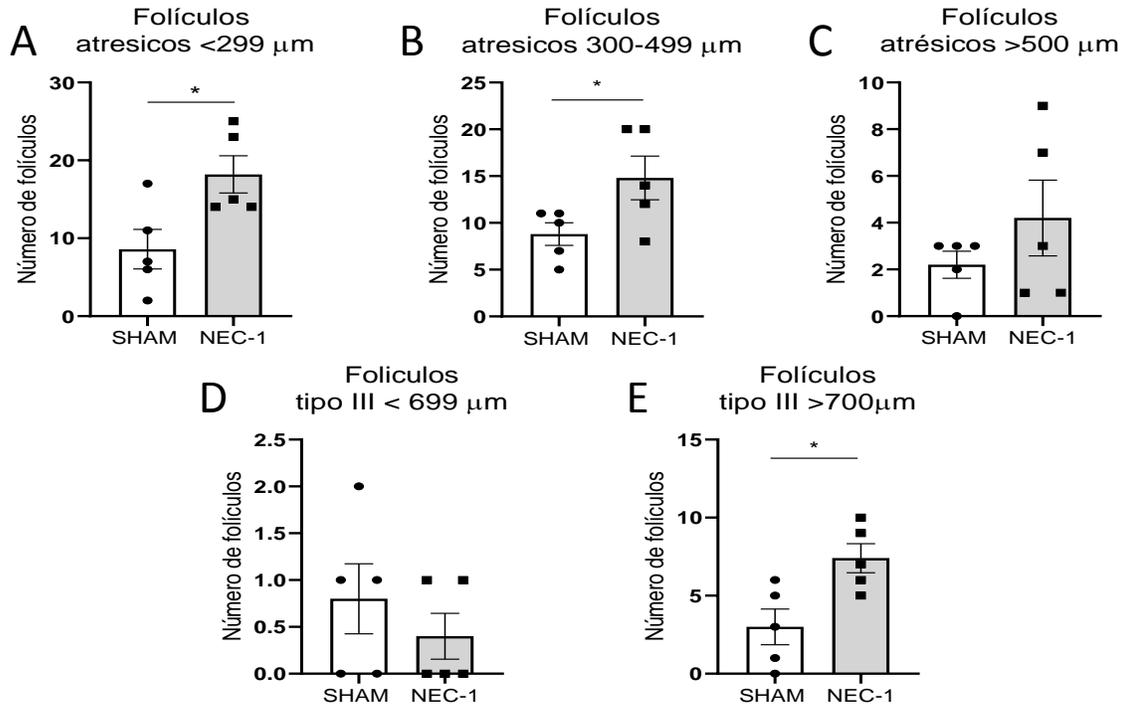


**Figura 18: Efecto de NEC-1 sobre la morfología ovárica de rata.** Folículos secundarios (A); cuerpo lúteo (B); folículos antrales sanos (C); folículos de tipo III (D); folículos antrales atrésicos (E); Quistes (F). Los grupos corresponden al tratamiento *sham* y NEC-1; todos los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM. N = 5. p <0,05 \*; p <0,01 \*\*, test Mann–Whitney.

Para analizar el grupo de folículos atrésicos afectados por la exposición a NEC-1, reordenamos los folículos atrésicos por tamaño (Fig. 19 A, B y C). El mayor número de folículos atrésicos se localizó en los menores de 500 y 300  $\mu$ m de diámetro sin efecto sobre los folículos mayores de 500  $\mu$ m.

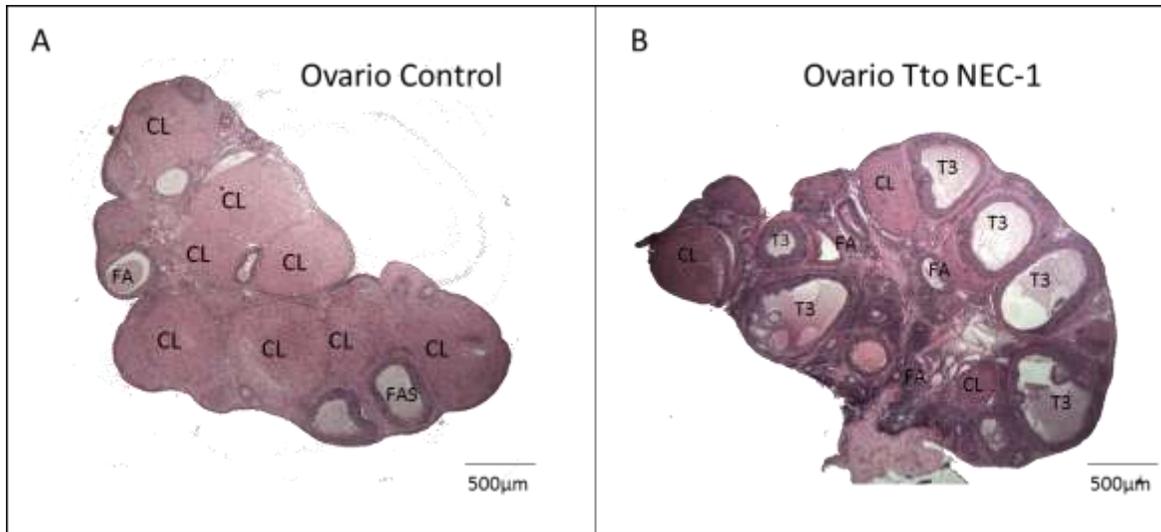
Respecto a las estructuras pre-quisticas, como los folículos tipo III, encontramos que éstos aumentaron en número (Fig. 19 D), no así el número de quistes. Se analizaron los folículos

pre-quisticos por tamaño y se encontró que el mayor número de estructuras pre-quisticas (folículos de tipo III) se localizó en los tamaños más grande (más de 700  $\mu\text{m}$ ), correspondiente a las estructuras recién formadas.



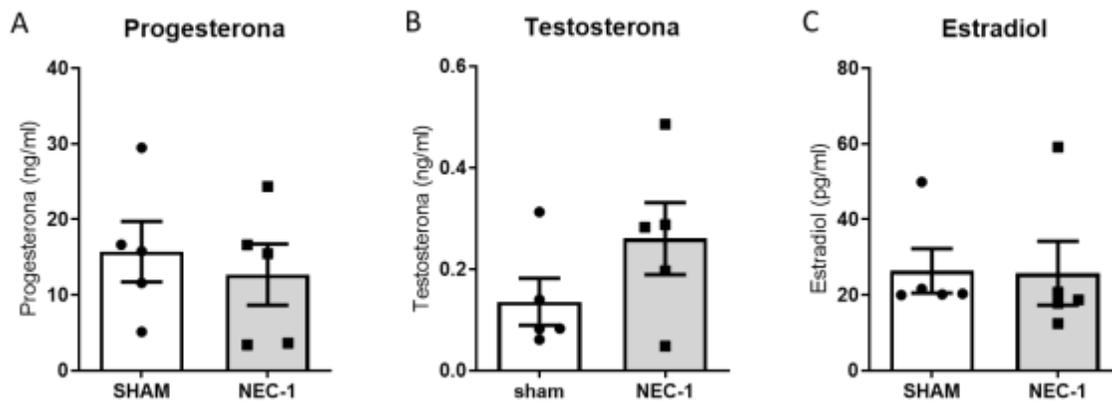
**Figura 19: Efecto de NEC-1 sobre el tamaño de los folículos atresicos y los folículos de tipo III en ovario de rata.** Folículos atresicos <299  $\mu\text{m}$  (A); Folículos atresicos 300-499  $\mu\text{m}$  (B); Folículos atresicos > 500  $\mu\text{m}$  (C); folículos de tipo III <699  $\mu\text{m}$  (D); folículos de tipo III >700  $\mu\text{m}$  (E). Los grupos corresponden al tratamiento simulado y NEC-1; todos los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM. N=5.  $p < 0,05$  \*, t-test o Mann-Whitney test.

En resumen, el tratamiento con NEC-1 afectó a nivel morfológico a los folículos atresicos pequeños y Folículos tipo III, en su tamaño y cantidad (ver figura 20).



**Figura 20: Corte central de ovarios.** Ovario control (A); ovario tratado con NEC-1 durante 28 días (B). CL: cuerpo lúteo; FA: folículo antral; FAS: folículo antral sano; T3: folículo tipo III.

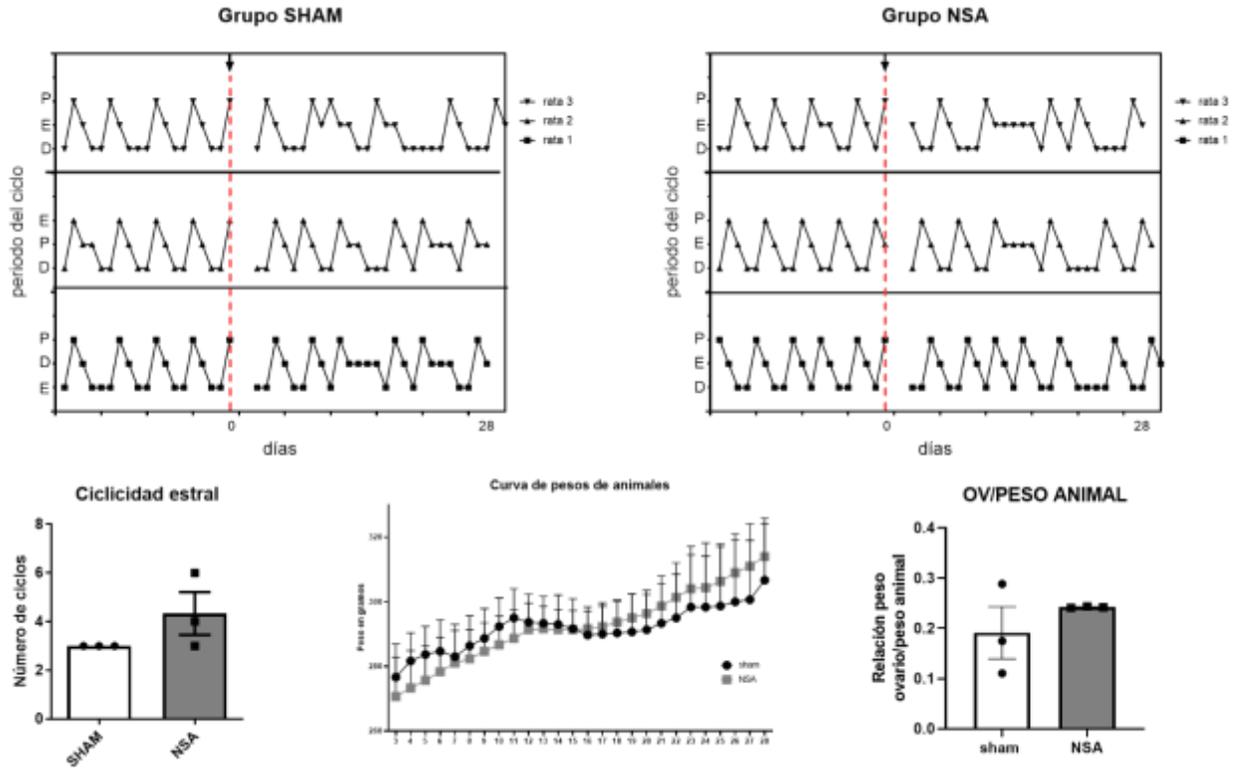
Finalmente, para evaluar la función ovárica, se evaluó los niveles plasmáticos de los distintos niveles de las hormonas esteroidales. El tratamiento con NEC-1 no modificó las concentraciones plasmáticas de progesterona, testosterona o estradiol: progesterona Sham  $15,7 \pm 4,0$  ng / ml frente a NEC-1  $12,7 \pm 4,05$  ng / ml); testosterona (Sham  $0,14 \pm 0,047$  ng / ml frente a NEC-1  $0,26 \pm 0,07$  ng / ml) y estradiol (Sham  $26,40 \pm 5,89$  pg / ml frente a NEC1  $25,77 \pm 8,45$  pg / ml) (Figura 21 A, B y C). Cuando comparamos la relación testosterona / estradiol, se observó un aumento significativo en la relación (Sham  $0,0040 \pm 0,0011$  frente a NEC-1  $0,0104 \pm 0,0021$ ;  $P < 0,05$ ). Este valor podría relacionarse con un aumento de los folículos antral atrésicos, debido a que estos cuentan muchas veces con granulosa en vías de muerte celular, las que probablemente no logren la conversión de testosterona a estradiol mediante la enzima aromatasa.



**Figura 21: Niveles Hormonales en plasma finalizado el tratamiento de NEC-1.** Todos los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM. N=5.  $p < 0,05$  \*, t-test o Mann–Whitney test.

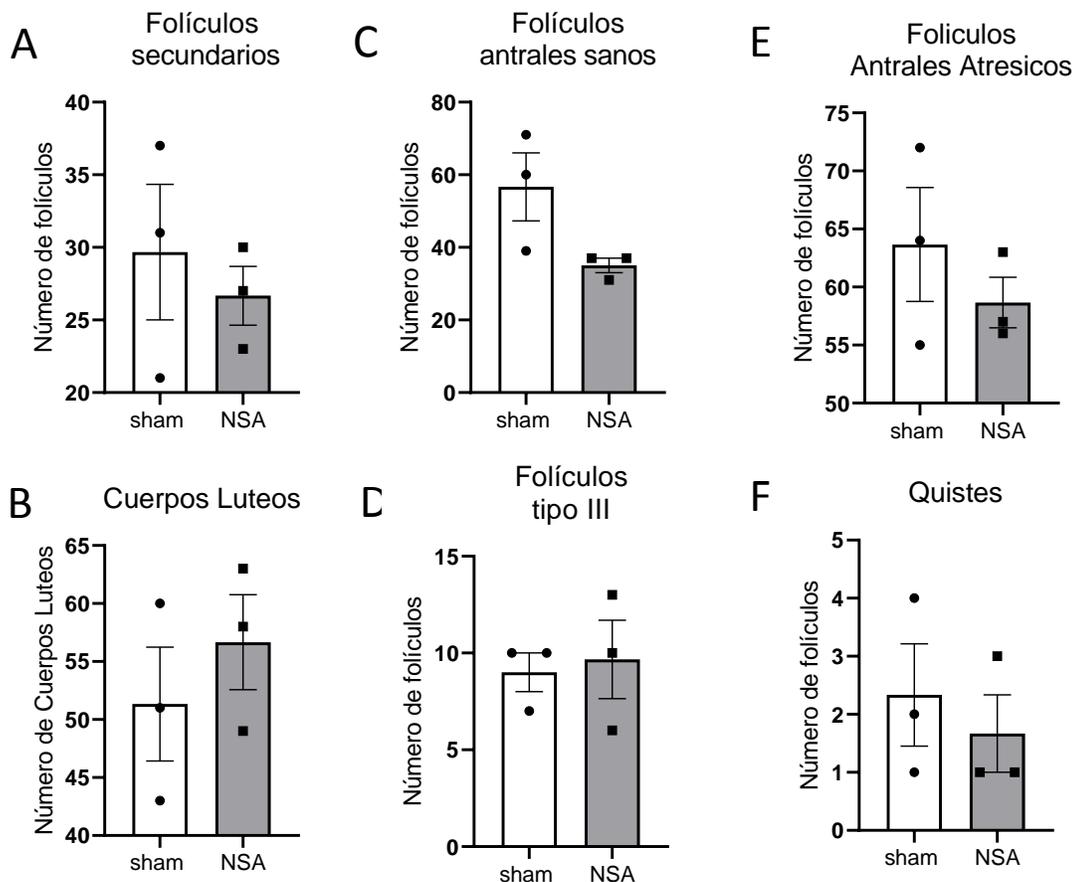
### **3.2 Evaluación de los efectos a la exposición intrabursal crónica de NSA en la función ovárica.**

Con el objetivo de analizar la participación de la necroptosis en la función ovárica se realizaron los mismos experimentos anteriores pero esta vez con otro inhibidor de la necroptosis (NSA), el cual es capaz de inhibir a un nivel distinto de la cascada transduccional la muerte celular por necroptosis que el fármaco anteriormente utilizado. Dado que es un fármaco distinto, nuevamente evaluamos los parámetros anteriormente analizados. La evaluación diaria de ciclicidad estral no mostro cambios significativos en el número de ciclos (Figura 22 A, B y C). Tampoco se vio afectado el número el peso de los animales (Figura 22 D), como tampoco la relación peso ovario y peso animal (Figura 22 E). Como con el tratamiento anterior, éstos parámetros evaluados nos indicarían que el tratamiento no fue perjudicial para el animal, y el tratamiento de 28 días no fue capaz de modificar significativamente el número de ciclos de los animales en estudio.



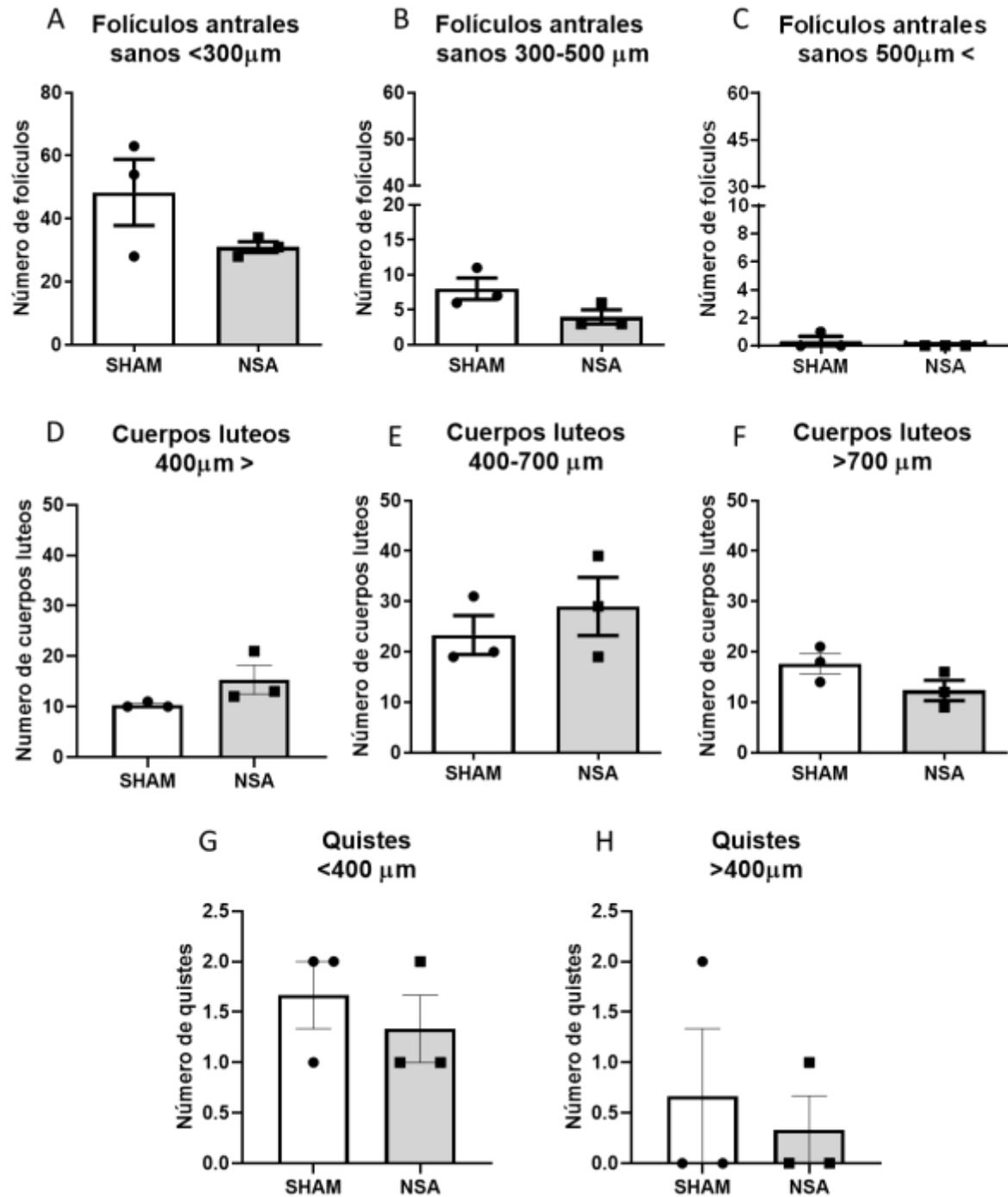
**Figura 22: Efectos generales de la administración de NSA.** (A) y (B) Diagrama de ciclicidad estral de animales sham y tratados con NSA respectivamente; Se grafica como P=proestro, E=estro y D=diestro 1 y diestro 2. La ciclicidad se evaluó mediante frotis vaginal diario y observación al microscopio. La línea segmentada indica el día de inicio del tratamiento. (C) Número de ciclos, un ciclo estral normal se considera como el paso de P a E, seguido necesariamente por un D. Se graficaron como el promedio  $\pm$ SEM. (D) Curva de Peso de animales, se graficó el promedio  $\pm$ SEM de los pesos registrados diariamente de los animales sham y NSA durante el periodo de tratamiento. (E) Relación Peso ovario y peso animal.

Tras el tratamiento de 28 días con NSA, no se observaron cambios en el número de las diferentes estructuras foliculares analizadas (folículos secundarios, folículos antrales, folículos antrales atrésicos, Cuerpos lúteos, folículos tipo III y quistes) (fig. 23 A, B, C, D, E y F).



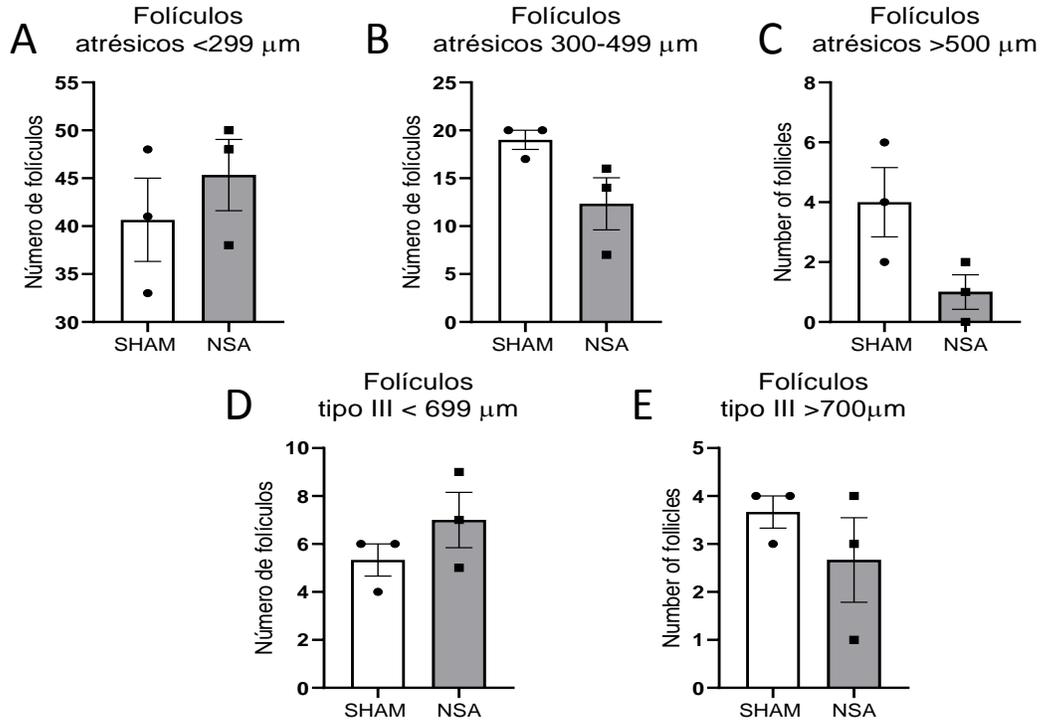
**Figura 23: Efecto de NSA sobre la morfología ovárica de rata.** Folículos secundarios (A); cuerpo lúteo (B); folículos antrales sanos (C); folículos de tipo III (D); folículos antrales atrésicos (E); Quistes (F). Los grupos corresponden al tratamiento simulado y NSA; todos los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM.

Al analizar la distribución de tamaño de los folículos antrales sanos, cuerpos lúteos y quistes, no se observaron cambios en la distribución de tamaño (Figura 24 A, B, C, D, E, F, G y H).



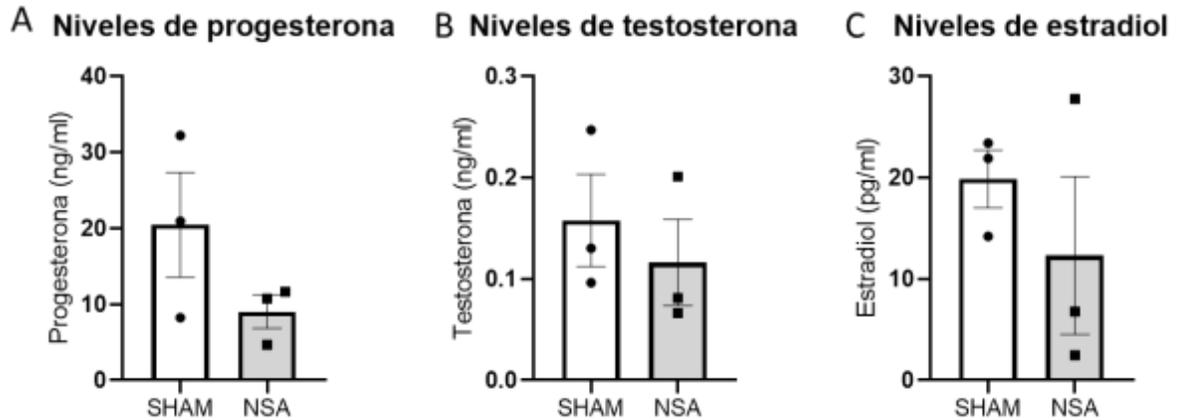
**Figura 24: Efecto de NSA sobre el tamaño de los folículos antrales sanos, cuerpos lúteos y quistes en ovario de rata.** (A), (B) y (C) Folículos antrales sanos de tamaños <300 µm; 300-500 µm y >500 µm respectivamente; (D), (E) y (F) Cuerpos lúteos de tamaños <400 µm, 400-700 µm y >700 µm respectivamente; (G) y (H) Quistes de tamaños <400 µm; y >400 µm respectivamente. Los grupos corresponden al tratamiento simulado y NSA; todos los valores corresponden a la media ± SEM. N=5. p<0,05 \*, t-test o Mann-Whitney test

Al analizar el tamaño de los folículos atrésicos y folículos tipo III (estructuras donde la distribución cambió con el tratamiento NEC1), no se observaron cambios al compararlos con el grupo control (Fig. 25 A, B, C, D y E).



**Figura 25: Efecto de NSA sobre el tamaño de los folículos atrésicos y los folículos de tipo III en ovario de rata.** Folículos atrésicos <299  $\mu\text{m}$  (A); Folículos atrésicos 300-499  $\mu\text{m}$  (B); Folículos atrésicos > 500  $\mu\text{m}$  (C); folículos de tipo III <699  $\mu\text{m}$  (D); folículos de tipo III >700  $\mu\text{m}$  (E). Los grupos corresponden al tratamiento simulado y NSA; todos los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM.

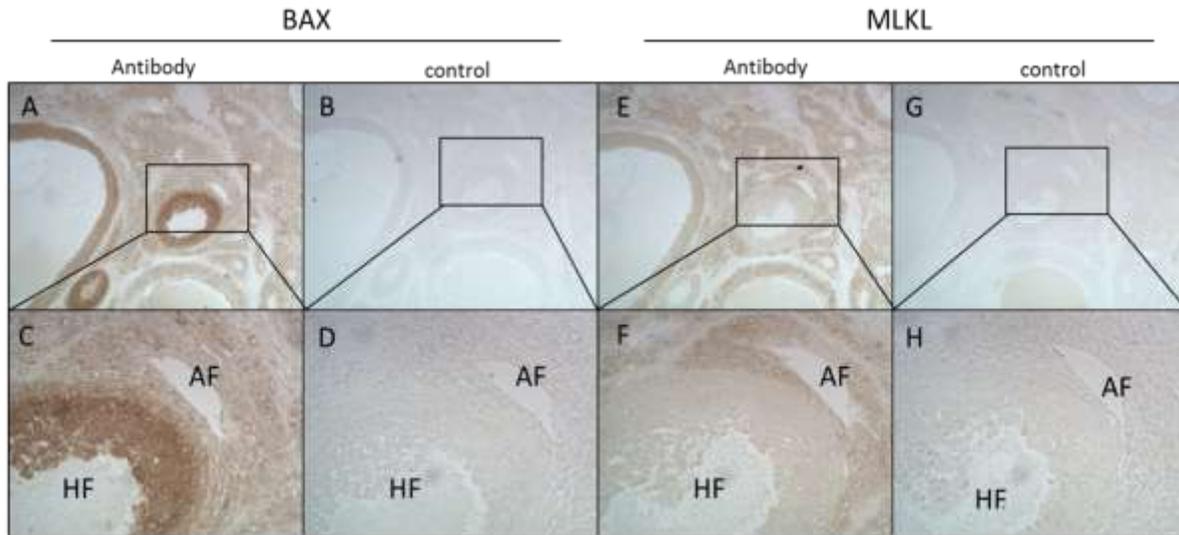
Los niveles hormonales de progesterona, testosterona y estradiol no se vieron afectados en ambas condiciones en este grupo (Figura 26 A, B y C).



**Figura 26: Niveles Hormonales en plasma finalizado el tratamiento de NEC-1.** Todos los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM. N=5.  $p < 0,05$  \*, t-test o Mann-Whitney test.

### 3.3 Efectos en marcadores moleculares de la necroptosis por el tratamiento con NEC-1 y NSA en ovario de ratas

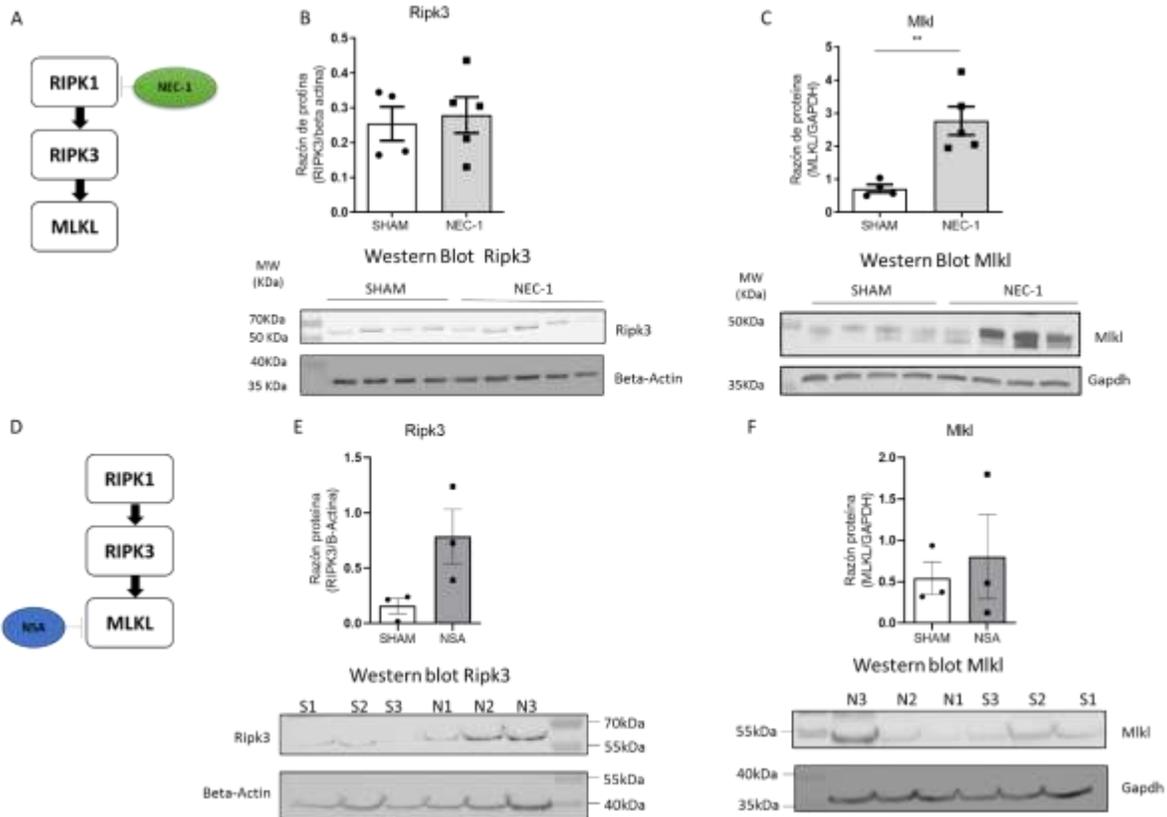
La proteína proapoptótica Bax es un miembro de la familia de proteínas Bcl2, y su participación parece ser esencial para que las células de la granulosa pasen a la atresia; sin embargo, no es esencial para la atresia folicular (Greenfeld et al. 2007). En este contexto, usamos esta proteína para marcar las diferentes estructuras donde puede estar involucrada la muerte celular por apoptosis, y se utilizó Mkl total como marcador de estructuras que podrían morir por necroptosis. La señal de Bax se presenta principalmente en las células de la granulosa de folículos antrales en desarrollo, en folículos secundarios y en los de tipo III (Fig. 27 A-D). Sin embargo, se ve una marca muy tenue en los folículos atrésicos formados solo por células de teca hipertrofiadas. Alternativamente, Mkl no marcó los folículos sanos, pero sí marcó los folículos atrésicos formados solo por teca hipertrofiada y folículos atrésicos que pasaran a formar el estroma (Fig. 27E-H). También hay marca en las células de la granulosa de folículos tipo III para ambos marcadores (Fig. 27 A y E), sugiriendo que en esta última estructura participan ambas vías relacionadas con la muerte celular.



**Figura 27: Distribución de Bax y Mkl1 en ovario de rata.** El recuadro muestra un folículo antral sano (HF) y un folículo antral atrésico viejo (FA)

La exposición in vivo del ovario a NEC-1, un inhibidor alostérico de Ripk1, no modificó la expresión de Ripk3, la proteína cascada abajo de Ripk1 y que es fosforilada por esta (Fig. 28A). La expresión de Mkl1, la proteína final de la cascada necroptótica, se expresó en gran medida después de la inhibición crónica de Ripk1 (Fig. 28B). En ambos casos, usamos el anticuerpo para la proteína total y no la enzima fosforilada (y activa) porque no había anticuerpos disponibles comercialmente. Sin embargo, el valor podría representar la masa total de proteína que podría movilizarse cuando se produce la fosforilación.

La exposición del ovario durante 28 días a necrosulfonamida (NSA), un fármaco que se une al dominio 4HB de Mkl1 para inhibir la dimerización y, por lo tanto, ejercer el programa necroptótico, produjo una tendencia al aumento en la proteína Ripk3, pero no modificó su propia expresión (Fig. 28 C y D), sin embargo, es necesario aumentar el número de especímenes para poder asegurar dicha tendencia. En este caso, también usamos un anticuerpo para medir la cantidad total de proteína y no la forma fosforilada. Esta forma total nos da cuenta de cambios crónicos para la proteína y no cambios rápidos derivados del estado fosforilado.

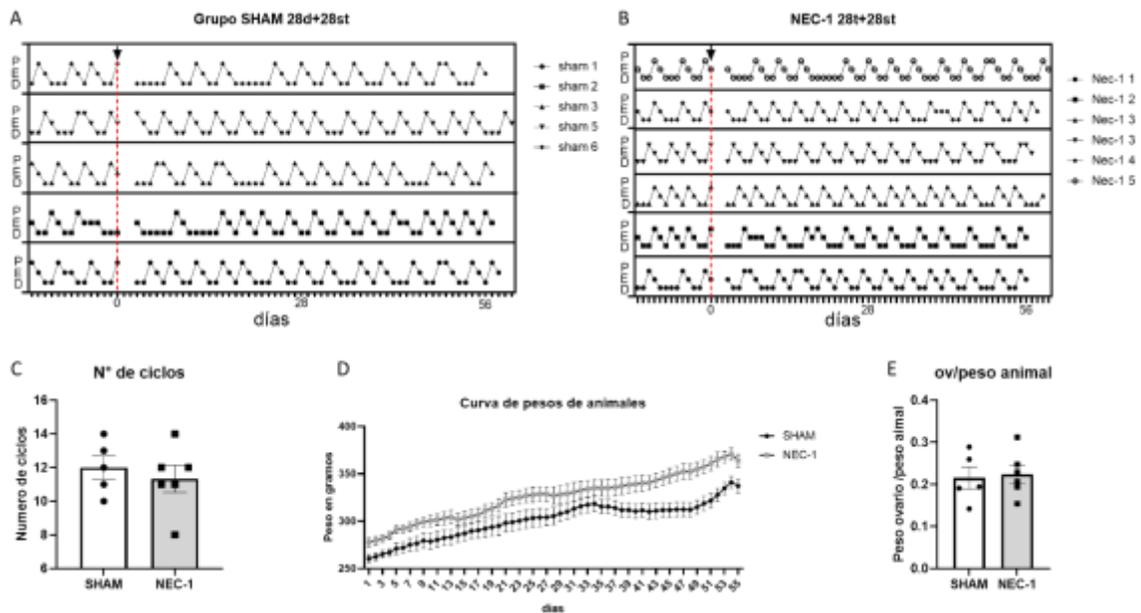


**Figura 28: Cambios en los marcadores de necroptosis después del tratamiento con NEC-1 en ovarios de rata.** Esquema de proteínas blanco de fármacos utilizados (A y D). Los niveles de proteína de Ripk3 en comparación con la beta-actina (B y E) o los gráficos de barras muestran la cuantificación de los niveles de proteína de Mkl1 en comparación con el control de Gapdh en cada condición (C y F). Los píxeles se contaron utilizando el software ImageJ (Institutos Nacionales de Salud de EE. UU., Bethesda, Maryland, EE. UU.). Análisis de transferencia Western de Ripk3 (~ 60 kDa), Mkl1 (~ 55 kDa), Gapdh y beta-actina en el ovario. Se muestran membranas representativas de cada proteína. Todos los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM.  $p < 0,05$  \*, prueba de Mann-Whitney) (sham n = 4; NEC-1 n = 5) y NSA (n = 3)

### 3.4 Efectos del tratamiento por 4 semanas con NEC-1 más 4 semanas sin tratamiento

Dado que los principales efectos se vieron en las estructuras pre-quísticas, y estas estructuras toman al menos 4 semanas en formarse como quistes (Bernuci et al. 2008), se decidió trabajar con un nuevo grupo el cual recibiría el tratamiento con NEC-1 por 28 días, pero adicionalmente se dejaron 28 días más para visualizar el proceso de formación de este tipo de estructuras. Al igual que en los casos anteriores se les evaluó la ciclicidad estral durante el tratamiento y el tiempo post tratamiento. Como se vio en los grupos tratados durante 28 días, en este grupo

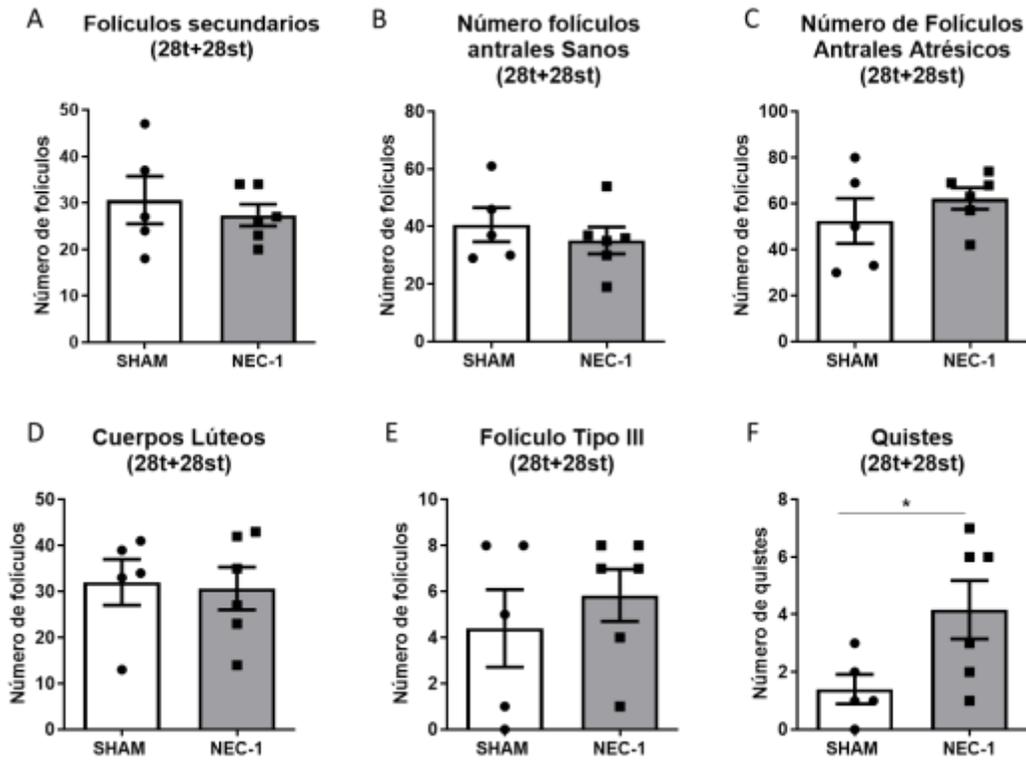
tampoco se observaron cambios en el ciclo estral durante los 28 días, como tampoco en la relación peso ovario y animal (figura 29 A, B y C). En la curva de peso se ve una diferencia entre los valores de ambas curvas, que corresponden a una línea paralela que parte desde el inicio del tratamiento porque los grupos experimentales tienen una diferencia de peso desde el inicio. (figura 29 D) que no afecta el peso del ovario en relación al peso de la rata (figura 29 E).



**Figura 29: Efectos generales de la administración de NEC-1.** (A) y (B) Diagrama de ciclicidad estral de animales sham y tratados con NSA respectivamente; Se grafica como P=proestro, E=estro y D=diestro 1 y diestro 2. La ciclicidad se evaluó mediante frotis vaginal diario y observación al microscopio. La línea segmentada indica el día de inicio del tratamiento. (C) Número de ciclos, un ciclo estral normal se considera como el paso de P a E, seguido necesariamente por un D. Se graficaron como el promedio  $\pm$ SEM. (D) Curva de Peso de animales, se graficó el promedio  $\pm$ SEM de los pesos registrados diariamente de los animales sham y NSA durante el periodo de tratamiento. (E) Relación Peso ovario y peso animal.

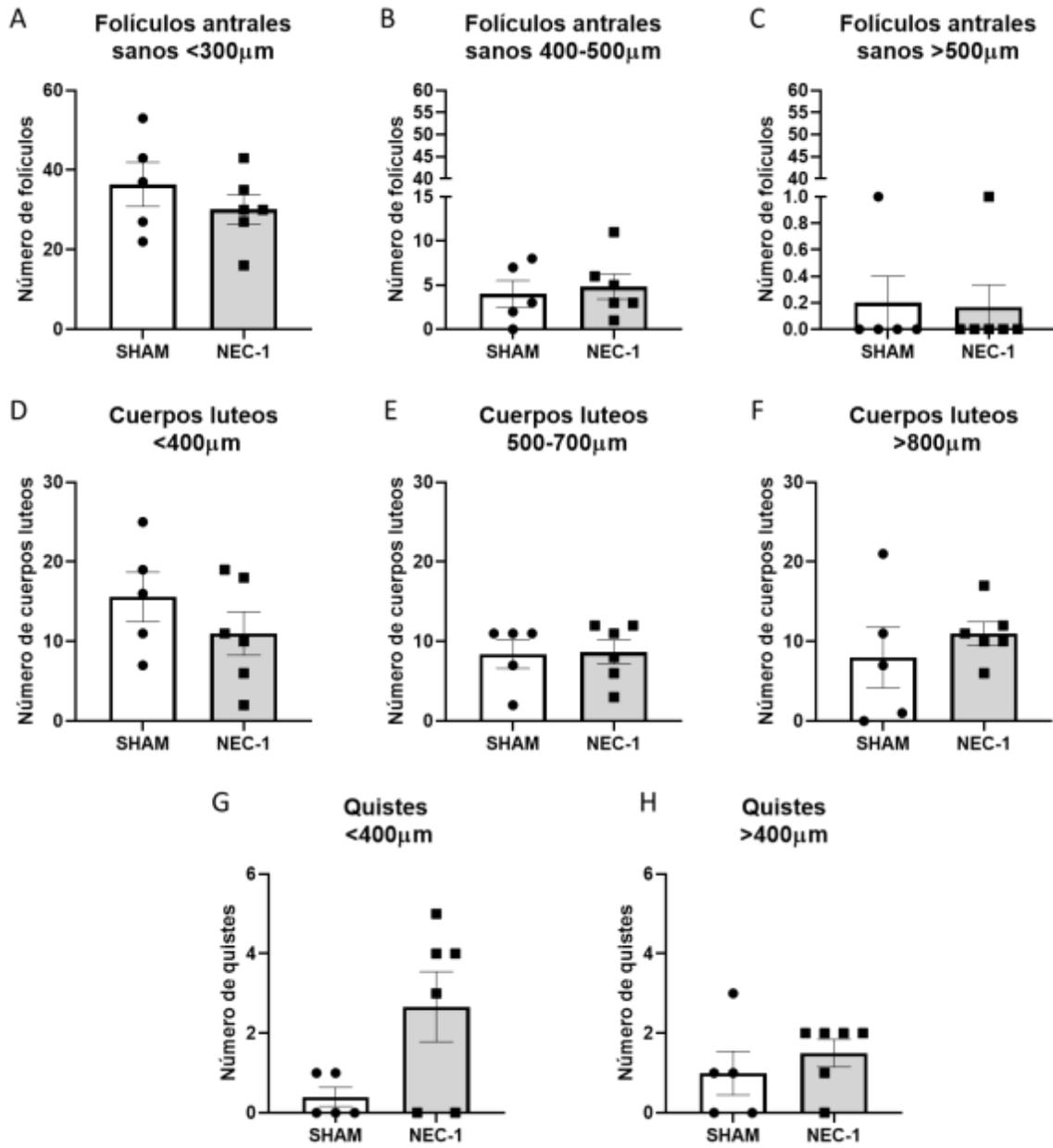
Respecto a las distintas poblaciones foliculares presentes en el ovario, se observó que la administración crónica de NEC-1 no modificó en número de los folículos secundarios, antrales sanos, atrésicos, cuerpos lúteos y folículos tipo 3 (figura 30 A, B, C, D, E), sugiriendo que el efecto que se manifestó a las 4 semanas (mientras se entregaba el fármaco) en los folículos antrales y tipo III, es transitorio y dependiente de la presencia del fármaco sin afectar el desarrollo de esas estructuras foliculares. Sin embargo, la población de quistes aumentó en este grupo, lo que podría indicar que está ocurriendo una transición

desde los folículos antrales hacia folículos tipo III y finalmente a quistes, proceso que ocurre durante el segundo mes de observación (figura 30 F).



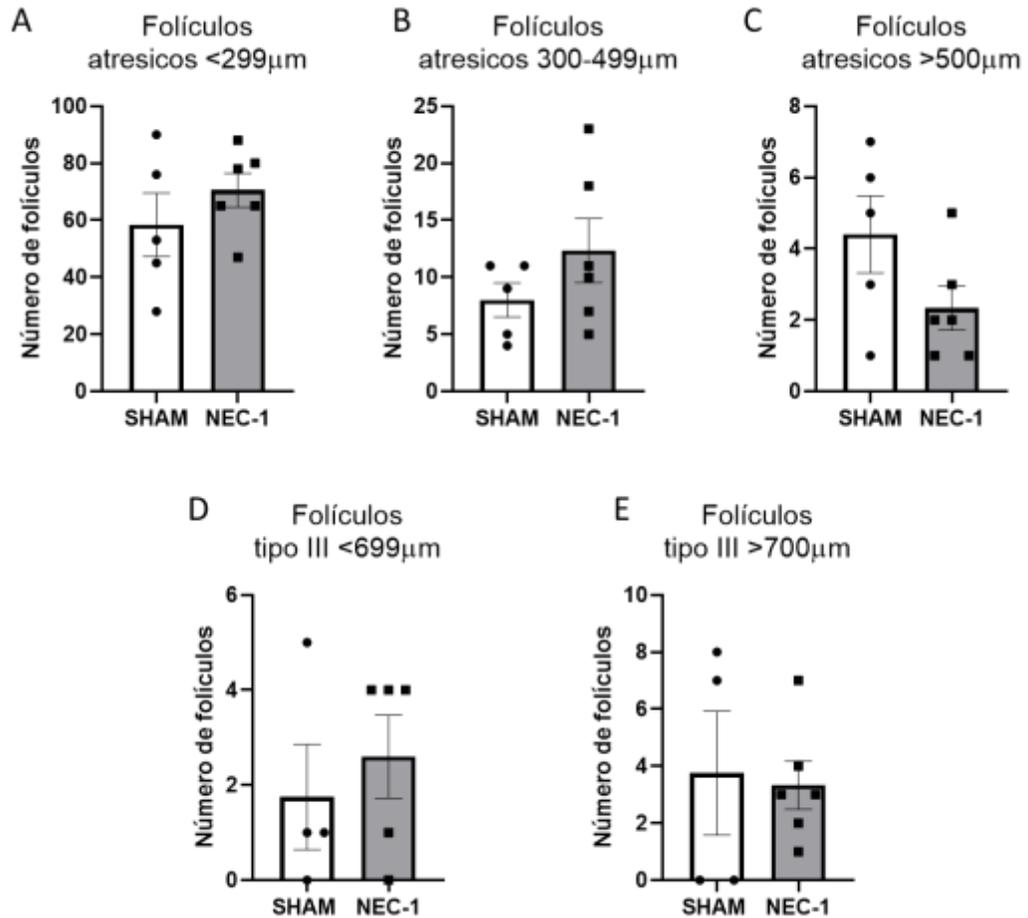
**Figura 30: Efecto de NEC-1 sobre la morfología ovárica de rata posterior a 28 días sin tratamiento.** Folículos secundarios (A); cuerpo lúteo (B); folículos antrales sanos (C); folículos de tipo III (D); folículos antrales atrésicos (E); Quistes (F). Los grupos corresponden al tratamiento *sham* y NEC-1; todos los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM. N = 5. p < 0,05 \*; p < 0,01 \*\*, test Mann–Whitney

Al analizar los tamaños de estas estructuras no vemos cambios en la distribución de los folículos antrales sanos, Cuerpos Lúteos, ni quistes (Fig. 31 A-H).



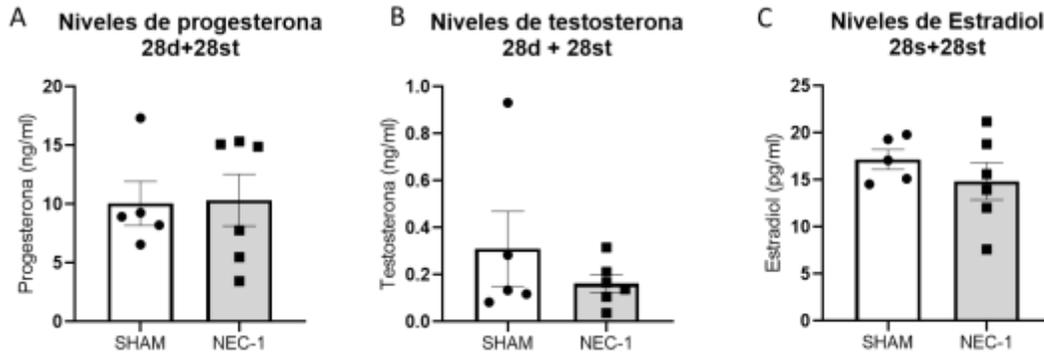
**Figura 31: Efecto de NEC-1 por 28 días y 28 días sin tratamiento sobre el tamaño de los folículos antrales sanos, cuerpos lúteos y quistes en ovario de rata.** (A), (B) y (C) Folículos antrales sanos de tamaños <300 μm; 300-500 μm y >500 μm respectivamente; (D), (E) y (F) Cuerpos lúteos de tamaños <400 μm, 400-700 μm y >700 μm respectivamente; (G) y (H) Quistes de tamaños <400 μm; y >400 μm respectivamente. Los grupos corresponden al tratamiento simulado y NSA; todos los valores corresponden a la media ± SEM. N=5. p<0,05 \*, t-test o Mann–Whitney test

Respecto a los folículos atresico y folículos tipo III, los cuales habían cambiado su distribución al mes de tratamiento, al dejar pasar 4 semanas más, no es posible ver esa diferencia en la distribución de sus tamaños (figura 32 A, B, C, D, E).



**Figura 32: Efecto de NEC-1 sobre el tamaño de los folículos atresicos y los folículos de tipo III en ovario de rata.** Folículos atresicos <299  $\mu$ m (A); Folículos atresicos 300-499  $\mu$ m (B); Folículos atresicos > 500  $\mu$ m (C); folículos de tipo III <699  $\mu$ m (D); folículos de tipo III >700  $\mu$ m (E). Los grupos corresponden al tratamiento simulado y NSA; todos los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM.

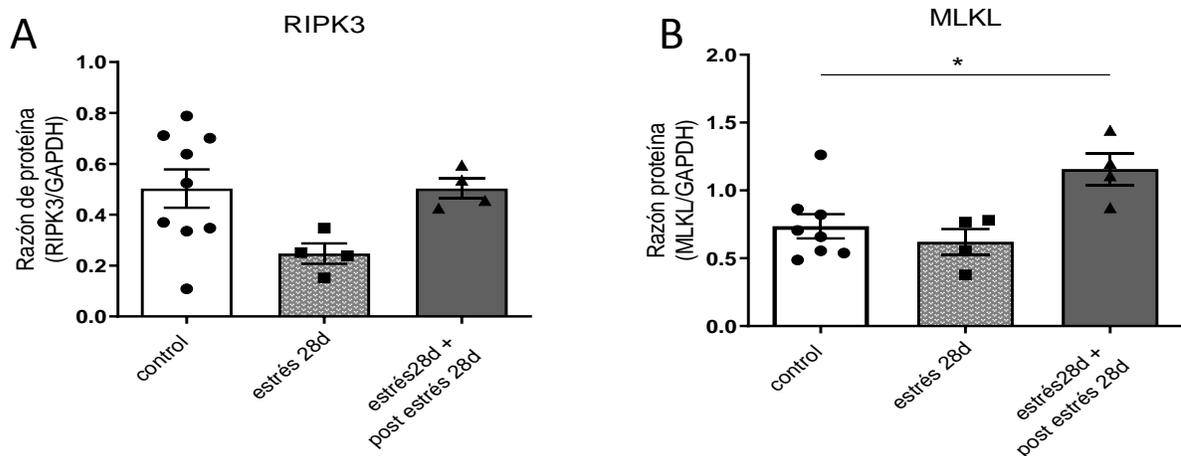
Los niveles hormonales de progesterona, testosterona y estradiol no se vieron afectados en ambas condiciones en este grupo (Figura 33 A, B y C).



**Figura 33: Niveles Hormonales en plasma finalizado el tratamiento de NEC-1.** Todos los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM. N=5.  $p < 0,05$  \*, t-test or Mann-Whitney test.

### 3.5 Efectos en la necroptosis en un modelo fisiopatológico de SOP por estrés simpático

Un modelo conocido de fenotipo poli-quístico en rata es el producido por una sobre activación del sistema simpático, el cual se logra por la exposición de los animales a estrés por frío durante 28 días y posteriormente esperar 28 días sin estrés antes de realizar la eutanasia (Bernuci et al. 2012). Como forma de relacionar si los cambios observados en este fenotipo (aumento de estructuras quísticas y atresia folicular), se correlacionaron con los cambios en las proteínas necroptóticas, analizamos la expresión de Ripk3 y Mkl1 en los ovarios de ratas expuestas a estrés por frío durante 28 días y ratas 28 días estrés y 28 días después de la exposición al estrés según lo publicado en (Riquelme et al. 2019). Después de 28 días de exposición diaria al estrés (3 h / día, a 4 ° C), disminuyó la cantidad de proteína total Ripk3, sin embargo, ésta se recuperó después de un mes de terminada la exposición a stress. (Fig. 34 A). Respecto a la proteína Mkl1, no cambió durante el proceso de exposición a estrés, pero aumentó después de un mes de terminada la exposición al estrés (cuando el fenotipo quístico ya está establecido) (Fig. 34 B).



**Figura 34: Marcadores de necroptosis en el modelo SOP en ovarios de rata.** Los gráficos de barras muestran la cuantificación de los niveles de proteína de Ripk3 en comparación con el control de Gapdh en cada condición (A) o los niveles de proteína de Ripk3 (B). Los grupos corresponden al control (Control), 28 días de exposición al estrés por frío (St 28d) y 28 días de exposición al estrés por frío seguidos de un periodo post-estrés de 28 días (St 28d + p / st 28d) (simulacro n = 5; St 28d n = 4; st 28d + p / st 28d n = 4); Todos los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM.  $p < 0,05$  \*, prueba de Mann-Whitney)

## **5. Discusión**

El funcionamiento normal del ovario depende de la acción concertada de diferentes señales moleculares, de origen local, sistémico y neurogénico. El entender estos procesos permitirá comprender y regular las variaciones en estos sistemas para evitar que se generen las patologías. En este contexto, hemos aportado al conocimiento del control de la ACh - principal neurotransmisor del sistema parasimpático – a la función del ovario. El hecho que la principal fuente de ACh sobre los folículos es intra-ovárica y principalmente de origen celular, cambia el concepto de regulación neuronal clásica y dependiente del flujo de impulsos que llegan al terminal nervioso, pero que se reafirma por la presencia de tres de los cinco subtipos de MR conocidos (M1/M3/M5) en el ovario de rata. Su localización estratégica en los folículos o en los vasos sanguíneos permite abrir un campo de estudios sobre el desarrollo folicular y el control del flujo sanguíneo y por ende de la entrega de esteroides que se bio-sintetizan en el ovario. El hecho de que un proceso fisiológico de regulación del desarrollo folicular como lo es la atresia folicular esté bajo control de la ACh, abrió un campo interesante para conocer los mecanismos de atresia involucrados en este proceso. Esto es especialmente importante debido a la variedad de mecanismos celulares involucrados en la atresia folicular ovárica. Si bien la apoptosis es un mecanismo reconocido como importante, en la segunda parte del trabajo de tesis nos focalizamos en la necroptosis como uno de los mecanismos importantes que regulan los procesos de atresia folicular y especialmente en el desarrollo de quistes foliculares en las condiciones de un fenotipo de ovario poli-quístico, el símil a la patología más importante en la infertilidad en mujeres durante su vida reproductiva.

Objetivo 1.

### **1.1 Estudio de la inervación colinérgica ovárica**

De acuerdo a la evidencia bibliográfica, una de las dudas sobre la influencia de ACh es sobre el origen y función de la ACh ovárica. Existe poca claridad respecto a la inervación parasimpática neuronal que existe en el ovario. Se conoce que este

órgano recibe su inervación simpática de dos fuentes: (1) el nervio ovárico superior que se asocia a los ligamentos suspensorios (Lawrence and Burden 1980) y (2) el plexo ovárico (PN) que viaja a través de la arteria ovárica. El SON inerva predominantemente los componentes secretores del ovario, es decir, las glándulas intersticiales y los folículos, mientras que el PN son en su mayoría perivasculares (Lawrence and Burden 1980). El uso de dos estrategias de denervación (quirúrgica y química) nos da fuerte evidencia del origen intra-ovárico de la ACh. La denervación quirúrgica es muy efectiva para eliminar la NA pero no logró modificar a la ACh lo que da fuerte evidencia que la ACh en el ovario está localizada principalmente en células productoras de ACh como las células granulosas (Del Campo et al. 2019; Lara et al. 2002). Los resultados indican que la principal fuente de ACh que tiene el ovario no proviene del SON ni del PN. Un efecto similar se demostró con la denervación química con guanetidina en ratas neonatales, donde se produce una degeneración crónica de los nervios simpáticos y sensoriales, y por lo tanto una baja considerable en los niveles de NA en la rata una vez adulta (Lara et al 1990). Este tratamiento tampoco afectó los niveles de ACh, apoyando la idea que el origen de la ACh ovárica no sería de tipo neuronal.

## **1.2 Distribución intra-ovárica de los receptores muscarínicos.**

El hecho que el ovario de rata presenta principalmente receptores muscarínicos del tipo M1, localizados en las GC de los folículos primarios hasta los antrales, e inclusive en las células lúteas proponen un papel importante en la función de este neurotransmisor en el desarrollo folicular. Estos datos discrepan de los encontrados por Cruz et al, en donde mostraron que el M1 está principalmente localizado en las Células de la Teca. Posiblemente, una explicación a esta discrepancia se deba a las diferencias en la cepa de las ratas utilizadas (*Sprague Dawley* en nuestro estudio versus la cepa CIIZ-V en el estudio de Cruz et al 2015(Cruz et al. 2015). Además, a diferencia de nuestro estudio, en el trabajo de Cruz et al., no realizaron estudios de pre-adsorción y, lo que es más importante, utilizaron un anticuerpo diferente (sc-

9106, Santa Cruz Biotechnology frente a nuestro anticuerpo validado de Alomone Lab). De hecho, la especificidad de los anticuerpos es crucial ya que se han cuestionado las especificidades de muchos anticuerpos para este receptor (Rommel et al. 2015). Se necesitan más estudios por otros autores para resolver el problema. Respecto al receptor M3 encontramos muy bajos niveles de mensajero y no fue posible distinguir una marca clara en las IHQ. Trabajos anteriores mostraron la presencia del mensajero por RT-PCR de este receptor, estando presente principalmente en ovarios humano y en ovocito en macaco, no así en GC (Fritz et al. 2001). Esta diferencia puede deberse a la diferencia entre especie.

M5 se localizó asociado casi exclusivamente a los vasos sanguíneos que rodean los folículos, lo cual plantea la posibilidad de que M5 pueda estar involucrado en el control del flujo sanguíneo en el ovario. Interesantemente en otros tejidos, la ACh modifica el tono vascular al regular la producción local de óxido nítrico (NO) (Uchida 2014; Delsouc et al. 2016; Kozłowska, Majewski, and Jana 2014). Tal situación también puede existir en el ovario de rata y la activación de M5 podría mediar en la respuesta esteroideogénica al regular el flujo sanguíneo y, por lo tanto, indirectamente con la salida de esteroides del ovario (Uchida 2014).

### **1.3 Activación de los receptores y síntesis de esteroides**

Se ha visto que la administración de la ACh a un sistema *ex vivo* de ganglio mesentérico superior/PN/ovario, disminuyó la secreción de progesterona y aumentó la androstenediona en paralelo con un aumento en el óxido nítrico (NO). Esto sugiere una acción indirecta de la ACh sobre la secreción de esteroides del ovario (Delsouc et al. 2019). El hecho que en nuestros experimentos con el ovario *in vitro* no obtuviésemos efecto en la secreción de esteroides por agonistas colinérgicos muscarínicos (carbacol), ni tampoco en la expresión de las enzimas de biosíntesis de los esteroides en el ovario (experimentos realizados en colaboración con Alemania), fuertemente sugiere que la ACh no tiene un efecto directo sobre la biosíntesis de esteroides. Este sistema *in vitro* empleado, se ha utilizado previamente con éxito para estudiar el efecto local de las gonadotropinas, el

agonista beta-adrenérgico u otros péptidos del ovario (Squicciarini et al. 2018; Barria et al. 1993). Por lo tanto, es poco probable que haya existido algún problema relacionado con el método experimental. El estudio sobre los niveles de expresión de las enzimas que participan en la biosíntesis de esteroides fue realizado en colaboración con el laboratorio del Dr. A. Mayerhofer en Munich, Alemania.

#### **1.4 Efecto de la inhibición de los receptores en el desarrollo folicular**

Dada la existencia de un sistema colinérgico intra-ovárico que no participa en la regulación de la biosíntesis de esteroides, diseñamos un experimento para estudiar el efecto de la exposición intra-ovárica in vivo de un antagonista muscarínico (atropina) en el ovario durante 28 días. El tiempo de exposición se basó en el hecho de que una cohorte de folículos tarda al menos 28 días en alcanzar la ovulación (Greenwald 1994).

La exposición a atropina durante 28 días aumentó la presencia de folículos atrésicos. Ya en estudios previos se ha demostrado que las GC son capaces de responder a la ACh (Mayerhofer and Fritz 2002). Por el contrario, estudios más recientes realizados en ovarios de rata mostraron que el aumento intra-ovárico de ACh (por Huperzina) en ovario, conduce a un aumento del reclutamiento folicular, visto en un aumento de folículos secundarios pequeños, y promoción de la ovulación, dado al aumento en CL y disminución de estructuras quísticas (Urra et al. 2016). Dado que encontramos a receptores M1 presente en folículos pre-antrales, la ACh, actuando a través de M1, es probablemente responsable de los cambios en el desarrollo folicular temprano. Por el contrario, la atropina interfiere con esta acción promotora del crecimiento y, en consecuencia, provoca la muerte de GC y la atresia folicular. Esto sugiere fuertemente que el papel principal de la ACh en el ovario está relacionado con el desarrollo folicular regulando los procesos de atresia y proliferación celular que característicamente se ven en el folículo ovárico durante el desarrollo.

## **Objetivo 2**

### **2.1 Efecto del estrés en los receptores muscarínicos en ovario**

Cómo se ha descrito anteriormente en este trabajo, el modelo de estrés por frío en rata es un buen modelo de fenotipo de ovario poli-quístico. Se ha descrito, que al exponer las ratas a estrés crónico por frío durante 28 días, aumentan los niveles de NA y de ACh intra-ováricos (Riquelme et al. 2019), sin embargo, como se observó en este trabajo, este aumento no cambia los niveles de ARN mensajero de los receptores o en las proteínas de los receptores. Por lo tanto, el aumento de ACh no “regula a la baja” estos receptores, como se esperaría en un entorno neuronal, lo que sugiere un nivel de regulación diferente y quizás asociado al control endocrino de las células endocrinas del ovario.

### **2.2 Activación muscarínica sobre la secreción de esteroides en ovarios control y estrés**

Como se describió en el punto 1.3, los antecedentes y evidencias de este trabajo sugieren fuertemente que la ACh no interfiere, al menos directamente, en la secreción de esteroides y este tampoco se vería afectado en ovarios provenientes de animales estresados. El modelo de estrés utilizado en esta tesis ha sido utilizado con éxito en trabajos previos del laboratorio, y no se ha descrito cambios en los niveles hormonales plasmáticos de las distintas hormonas esteroidales (Riquelme et al. 2019, 2020; Dorfman et al. 2003), y dado que la ACh no ejerce un rol en la esteroidogénesis, tampoco lo haría en ovarios provenientes de estrés de 28 días y que presentan algunas alteraciones en la morfología de un animal control.

### **2.3 Efecto del bloqueo de los receptores muscarínicos sobre el desarrollo folicular del ovario de ratas control y estrés.**

Como se discutió en el punto 1.4 de esta discusión, el bloqueo de los receptores muscarínicos conduce a un aumento en la atresia. Se ha descrito que el estrés de 28 días aumenta el número de folículos con hipertecosis (Dorfman et al. 2003) y la proporción de folículos atrésicos es mayor que en un animal control (Riquelme et al. 2019). Como el bloqueo es a los receptores muscarínicos y estos de acuerdo a nuestro estudio, no se encuentran en células de la Teca, ni tampoco se afecta su expresión en estrés, es de esperar que no se vean distintos efectos al administrar atropina en condición control. Sin embargo, durante el estrés de 28 días también existe un aumento en el contenido intra-ovárico de ACh (Riquelme et al. 2019).

Esto sugiere fuertemente que el papel principal de la ACh en el ovario está relacionado con el desarrollo folicular regulando los procesos de atresia y proliferación celular que característicamente se ven en el folículo ovárico durante el desarrollo. La posibilidad de que la ACh participe en estos procesos de proliferación y atresia, nos llevó a plantearnos un grupo de experimentos para conocer los tipos de atresia que aparecen en los folículos ováricos, conocer los mediadores intracelulares que participan, y su localización intracelular. Finalmente tenemos que estudiar si existe relación entre la expresión de los marcadores intracelulares con la aparición de los distintos tipos de folículo y su relación con condiciones patológicas.

El estudiar la necroptosis se basó por varias evidencias que indicaban que, en el ovario, se presentaban no solo los marcadores bioquímicos del proceso necroptótico sino que además, debido a la importancia de la remodelación y del crecimiento y diferenciación folicular, podrían participar en forma importante el proceso de necroptosis además de los conocidos procesos de apoptosis como mecanismo de regulación. La necroptosis es un mecanismo de regulación de la sobrevivencia celular que ha adquirido gran importancia en los últimos años debido a su participación en distintos procesos fisiopatológicos, caracterizados por el desbalance entre la proliferación y la muerte celular (Jouan-Lanhouet et al. 2014; Dmitriev YuV 2017). En el caso del ovario, órgano que se caracteriza por un alto recambio celular debido al desarrollo constante y altamente regulado de los folículos ováricos, también se han identificado algunos de los marcadores moleculares involucrados en este tipo de muerte celular, como es fosfo-MLKL y RIPK3 total, tanto

en cultivos de células de granulosa humana como en tejidos de ovarios de simios y rata (Du et al. 2018; Blohberger et al. 2015). Sin embargo, aunque Du et al (2018), han usado bloqueadores farmacológicos de la necroptosis (NEC-1), aún no está esclarecido cual es el rol de este tipo de muerte celular en la función del ovario y menos aún su participación en modelos *in vivo* de patologías. Como forma de acercarnos a este proceso, en el presente trabajo y aprovechando la experiencia desarrollada por nuestro laboratorio en modelos experimentales *in vivo*, desarrollamos un modelo *in vivo* de administración intrabursal de dos distintos inhibidores de la necroptosis. El primero de ellos, la Necrostatina-1 (NEC-1), es un inhibidor alostérico de la proteína RIPK1 el cual ha sido ampliamente usado en distintos modelos de estudio de la necroptosis (Deng, Li, and Sun 2019; Liu et al. 2017). NEC-1 ha resultado ser una molécula altamente eficiente para la inhibición del proceso necroptótico, inhibe la autofosforilación de RIPK1, y, por lo tanto, inhibe la formación del complejo RIP1/RIP3 (Degterev et al. 2008; He et al. 2009). El segundo, la Necrosulfonamida (NSA), es un inhibidor de MLKL que no afecta su fosforilación y oligomerización, pero si inhibe su translocación a la membrana (unión a lípidos fosfatidilinositol y cardiolipina) y, por lo tanto, evita la ruptura de la membrana celular (Bansal, Sciabola, and Bhisetti 2019; Wang et al. 2014; Dong et al. 2017; Wang et al. 2018), y está documentado su efecto inhibitorio en células de granulosa ováricas humanas (Blohberger et al. 2015). En este trabajo se indagó por primera vez los efectos *in vivo* de ambos fármacos, mediante la administración crónica intrabursal, sobre la función ovárica y su posible participación en procesos fisiopatológicos *in vivo* en la función ovárica.

### **3.1 Efectos a la exposición intrabursal crónica de NEC-1 en la función ovárica.**

El aumento en el número de folículos atrésicos y estructuras pre-quísticas (como lo son los folículos tipo III), que ocurrió posterior al tratamiento con NEC-1, puede ser la consecuencia de un aumento en la vida de los folículos atrésicos debido a la inhibición de la atresia por necroptosis. Tanto los folículos atrésicos como los pre-quísticos, están altamente relacionadas con la muerte celular. Los folículos atrésicos

se forman a partir de folículos pre-antrales y antrales que no son seleccionados para ovular, y por lo tanto degeneran (Chun, Eisenhauer, Minami, Billig, et al. 1996). Este proceso está presente a lo largo de todo el desarrollo folicular, cuyas primeras características es la desorganización de la granulosa y aparición de núcleos picnóticos en estas células (Lara et al. 2000). A medida que avanza el proceso, se pierde completamente la granulosa y se mantiene una capa de teca hipertrofiada con aparente capacidad esteroidogénica (Teerds and Dorrington 1993). Aunque se ha estudiado la participación de la apoptosis en este proceso, considerándose como el principal mecanismo de muerte celular involucrada en el proceso de atresia folicular (Kaipia and Hsueh 1997), estudios más recientes han evidenciado que la participación de este tipo de muerte celular se reduce solo a un tipo celular y en cierta etapa del desarrollo. Meng 2018, ha estudiado distintos marcadores de muerte celular y ha propuesto que el proceso de apoptosis estaría principalmente presente en la atresia de folículos antrales, y más específicamente en la muerte de las células de granulosa (Meng et al. 2018). Nuestros resultados proponen a la necroptosis como un integrante importante también en el proceso de atresia, ya que su ausencia conduce a la acumulación de estructuras foliculares, especialmente las de tamaños más pequeños y en las estructuras más avanzadas donde ya no hay granulosa y solo queda varias capas de teca hipertrofiada. La concentración mayor de estructuras pequeñas en el ovario de los animales analizados, se puede explicar porque estos animales fueron eutanasiados durante la mañana del estro, el cual corresponde al periodo post ovulatorio donde no se encuentran folículos pre-ovulatorios (tamaños grandes) (Hirshfield and Midgley 1978). Sin embargo, aún en esta condición, el hecho que aumentaran aún más los folículos atrésicos pequeños en el grupo tratado con NEC-1, puede corresponder a folículos secundarios (pre-antrales), que corresponden a estructuras foliculares pequeñas previas a la aparición del antro, cuyo proceso atrésico no se conoce del todo, y su acumulación corresponde a la dependencia de este proceso a la muerte celular por necroptosis. Esta idea se apoya en que se ha encontrado evidencia de la presencia de los marcadores RIPK1 y RIPK3 incluso en granulosa de folículos pre-antrales (Du et al. 2018). Desde el punto de vista fisiopatológico también apoya la posibilidad de que

este tipo de muerte celular esté relacionado con el sistema colinérgico, donde el aumento intra-ovárico de Acetil colina por la inhibición de la acetilcolinesterasa, enzima que degrada este neurotransmisor aumenta la atresia de folículos pequeños en una ventana de tiempo similar (4 semanas de tratamiento)(Urrea et al. 2016).

Respecto a los folículos tipo III, que corresponden a estructuras previas a la formación de quistes ováricos (Brawer, Munoz, and Farookhi 1986; Lara et al. 2000). Estas estructuras presentan gran cantidad de granulosa, hipertecosis e invaginaciones por parte de las células de la teca hacia el interior del antro del folículo, viéndose en algunos casos pérdida de la lámina basal (Lara et al. 2000; Brawer, Munoz, and Farookhi 1986). Para que estas estructuras puedan formar quistes, deben morir las células de la granulosa, ya que el quiste propiamente tal no presenta este tipo celular, y solo presenta hipertecosis y muy escasamente alguna célula de granulosa (Brawer, Richard, and Farookhi 1989). Al inhibir la necroptosis vemos que estas estructuras aumentan, tanto en número como en tamaño, indicando que estas células no están muriendo y por lo tanto el tratamiento prolonga el tiempo de vida de esta estructura, lo cual se refleja en el aumento del número y el gran tamaño de estas. Considerando que estas estructuras están compuestas por un gran número de células de granulosa, estos resultados son comparables con los hallazgos del trabajo de Du 2018, donde estudian un sistema de cultivos en 3 dimensiones de folículos de primate. En el trabajo de Du et al (Du et al. 2018) encuentran que los folículos tratados con NEC-1 por 5 semanas presentan un mayor número de capas de células de granulosa al compararlos con los tratados con vehículo, reforzando la idea de que la muerte de las células de granulosa para un crecimiento apropiado del folículo depende del proceso necroptótico.

### **3.2 Evaluación de los efectos a la exposición intrabursal crónica de NSA en la función ovárica.**

A diferencia del tratamiento con NEC-1, la exposición a NSA no produjo cambios significativos en las distintas poblaciones foliculares analizadas, pero tampoco hubo cambios en los marcadores moleculares medidos (MLKL y RIPK3). Un resultado

similar fue anteriormente descrito (Dong et al. 2017), al analizar el efecto de NSA en células epiteliales de adenocarcinoma colorectal, la estimulación in vitro de la necroptosis, no produjo cambios de RIPK3-p ni tampoco de MLKL-p, a pesar que hubo una disminución en el número de células (Dong et al. 2017). Esto se debe a que NSA es capaz de unirse al dominio 4HB de MLKL y evita que los oligómeros formados de MLKL fosforilado ejerzan su función en la membrana celular. NSA se ha visto como un buen inhibidor de la necroptosis en algunos tipos celulares, pero no en ratón, dado que su target es el residuo Cys86 de la proteína MLKL humana (Wang et al. 2014). Sin embargo, otros trabajos si han demostrado la efectividad inhibitoria de la necroptosis de NSA en células cardiacas de rata (Dmitriev YuV 2017) . En granulosa humana in vitro se ha documentado el efecto inhibitorio de NSA en la necroptosis (Blohberger et al. 2015). El hecho que nosotros no demostráramos un cambio en los marcadores bioquímicos, ni en el desarrollo folicular sugiere que, al igual que en humanos, depende del tipo celular y a la especie.

### **3.3 Efectos en marcadores moleculares de la necroptosis por el tratamiento con NEC-1 y NSA en ovario de ratas**

Al analizar la inmunohistoquímica para BAX (marcador de apoptosis) (Matsuda-Minehata et al. 2006), vemos que esta marca se da principalmente en células de la granulosa y muy poca marca en células de la Teca de folículos en desarrollo. También fue posible hallar marca positiva para BAX en folículos pre-antrales. Si bien, la proteína BAX no nos asegura que la célula esté en ese momento muriendo por apoptosis, ya que es necesaria la conjugación con otras proteínas para desencadenar la muerte celular, su presencia si nos asegura que existe parte importante de la maquinaria de activación de este proceso, el cual se ha visto que es posible que ocurra en folículos pre-antrales bajo ciertas condiciones experimentales (Billig, Furuta, and Hsueh 1993), pero que difícilmente se da en un contexto fisiológico (Meng et al. 2018). En este contexto, BAX no se encontró en folículos atrésicos formados solo por células de la teca, ya sean provenientes de pre-antrales o antrales, sugiriéndonos que este tipo de muerte celular no se daría

en estas estructuras. Por su parte, cuando analizamos la marca por inmunohistoquímica de MLKL, un marcador de necroptosis, vemos que está presente en estas estructuras y en residuos foliculares que forman en el intersticio. Con este otro marcador sin embargo, nos encontramos con la interrogante sobre si efectivamente la muerte celular por necroptosis está ocurriendo, ya que en este caso utilizamos anticuerpo contra la proteína total y no su forma fosforilada (activa), debido a la no compatibilidad de los anticuerpos comerciales con nuestro modelo de estudio, sin embargo, podemos sugerir que en células de la teca hipertrofiadas presente en folículos atrésicos si existen las proteínas necesarias para desencadenar la muerte por necroptosis y no así BAX, necesaria para la apoptosis. Estos resultados son consistentes con el trabajo con animales KO para BAX, ya que demostraron que esta no es indispensable para la atresia, lo que podría sugerir la participación de otro tipo de muerte celular en la atresia folicular (Greenfeld et al. 2007), como podría ser la necroptosis.

Respecto a la marca en los Folículos tipo III con inmunohistoquímica con los dos distintos marcadores de muerte celular, vemos que en la granulosa de estas estructuras es posible ver marca de BAX como también de MLKL. Esto nos sugiere que este tipo de folículos, que corresponde a la transición de folículos antrales sanos hacia la formación de quistes, consta con ejecutores importantes de ambos procesos y que por lo tanto podría eventualmente utilizar ambos procesos. Sin embargo, estos folículos provienen de folículos pre-ovulatorios que no lograron ovular, y de acuerdo a lo documentado, estas estructuras no mueren por apoptosis (Chun, Eisenhauer, Minami, and Hsueh 1996), por lo tanto, podrían presentar la proteína BAX ya que provienen de folículos antrales que, aunque si se ha visto que su granulosa muere por apoptosis, al no ovular, estos terminen muriendo por necroptosis. En este trabajo, al bloquear la necroptosis con el tratamiento con NEC-1 vemos que estas estructuras se mantienen y en tamaños más grandes, sugiriendo que este tipo de muerte celular podría participar en el paso de folículo tipo III a quiste. Respecto a las células de la Teca en estas estructuras, vemos que BAX no está presente, pero si MLKL. Esto sugiere que la necroptosis participaría en la desaparición de estas estructuras también a nivel de células de la teca.

### **3.4 Efectos del tratamiento por 28 días con NEC-1 y sus efectos a largo plazo**

Cuando se realizó la exposición intrabursal con NEC-1 por 28 días y se estudió el efecto 28 días después, ya no existía el aumento en los folículos antrales atrésicos pequeños, es decir pasado 4 semanas al tratamiento, los folículos que se les había detenido el proceso de necroptosis al parecer reanudaron su proceso de degeneración. Por su parte, los folículos tipo III que habían aumentado con el tratamiento de NEC-1 de 4 semanas, tampoco mantuvieron el aumento, pero si se observó un aumento en el número de quistes. Esto se explica porque los folículos tipo III retomaron la vía de formación de quistes y por ende un aumento, lo que coincide con los tiempos más largos de formación de este tipo de estructuras (McGee and Hsueh 2000).

### **3.5 Efectos en la necroptosis en un modelo fisiopatológico de SOP por estrés simpático**

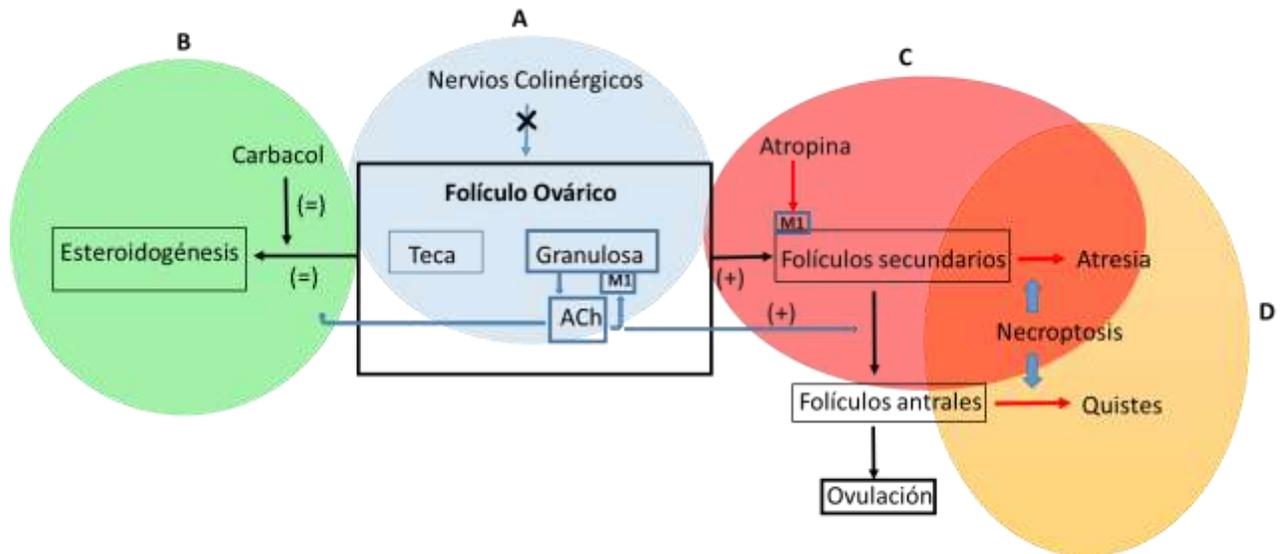
Un modelo interesante y bien estudiado, donde podemos estudiar la relevancia fisiopatológica del proceso de muerte celular por necroptosis, es el ovario poli-quístico. El ovario poli-quístico es la patología humana de origen reproductiva de mayor incidencia en mujeres durante su vida reproductiva. La exposición a estrés simpático reproduce en rata bastante bien la mayoría de las condiciones del síndrome en humanos y en esas condiciones, hemos observado un aumento en el proceso de formación de quistes y de esta forma útil para estudiar la relevancia del proceso de la necroptosis. Este modelo es producido por un aumento de la actividad simpática del ovario, y por ende aumenta el contenido y liberación de noradrenalina en el ovario que durante el proceso de formación de quistes que comienza a los 28 días de estrés, comienzan a aparecer las estructuras quísticas típicas del ovario poli-quístico. Este proceso se intensifica después de 28 días adicionales sin estrés que se caracteriza por un aumento en folículos de tipo III, pre-quistes y quistes (Dorfman et al. 2003; Riquelme et al. 2019; Bernuci et al. 2008; Bernuci et al. 2012). Cuando evaluamos los niveles totales de los marcadores de necroptosis en este

modelo, como lo son RIPK3 y MLKL, vemos que este último aumenta significativamente en el grupo estrés al compararlo con el grupo control. Si bien, dada las herramientas que tenemos, no podemos asegurar que el cambio en MLKL se corresponde o no con su forma fosforilada, curiosamente vemos el mismo efecto cuando tratamos a los animales con NEC-1, donde desarrollamos luego del tratamiento un fenotipo similar al modelo poli-quístico. Esto sugiere que la inhibición de la necroptosis podría generar en el ovario un fenotipo similar al que obtenemos en el modelo de ovario poli-quístico.

También en este modelo de estrés por frío de 28 días de exposición y de observación posterior por 28 días, disminuyeron los folículos secundarios y aumentaron los folículos atrésicos, que, si comparamos con nuestros resultados, aumentaron los folículos atrésicos más pequeños, que como mencionamos antes podrían corresponder a pre-antrales. Es decir, podemos verificar que los procesos de formación de quistes pueden ser reproducidos fácilmente y ahí podemos verificar las etapas de desarrollo folicular en las cuales la necroptosis es importante.

En resumen, en este trabajo por primera vez se estudió la participación in vivo de la necroptosis en el ovario. Los resultados sugieren la participación de este tipo de muerte celular en la desaparición de estructuras como los folículos antrales atrésicos y el paso de estructuras pre-quísticas a quísticas, estructuras altamente prevalentes en patologías como el ovario poli-quístico donde la función ovárica se ve alterada. El entendimiento de la formación de estas estructuras abre la ventana a posibles blancos farmacológicos para el tratamiento de esta patología. La relación entre la activación colinérgica, con los procesos de desarrollo de quistes y la necroptosis nos permitirán por un lado verificar las etapas en las cuales la necroptosis es importante y además abre nuevos blancos farmacológicos para el tratamiento de esta patología.

Se presenta un modelo (figura 32) que resume los principales hallazgos de este trabajo.



**Figura 35. Resumen de principales hallazgos.** Los folículos ováricos de rata no reciben una inervación colinérgica extraovárica directa. Se origina principalmente de una fuente intraovárica de acetilcolina (A). Esta ACh no regula la biosíntesis de esteroides hormonas y tampoco se manifiesta como un aumento en el eflujo de hormonas esteroides in vitro (B). El principal efecto es sobre el desarrollo folicular como fue demostrado por Urra et al, Sci Report, 2016.6: pág. 30129), o por la administración del agonista muscarínico carbaccol (Benítez et al. Front Endocrinol, 2021. 12: pág. 636600). La presencia de Atropina, un antagonista muscarínico bien conocido, aumenta la atresia de los folículos secundarios (C), proceso que es antagonizado por el estrés por frío, un proceso que aumenta la acetilcolina ovárica. (Riquelme et al. J Neuroendocrinol, 2020: p. e12914). La necroptosis participa en el proceso de atresia folicular y formación en el paso de pre-quiste a quiste (D).

## **6. Conclusiones**

En este trabajo se concluye que el sistema colinérgico del ovario es principalmente intra-ovárico, por lo que no reciben una inervación colinérgica extraovárica directa como en el caso de la NA. Los receptores muscarínicos se ubican en folículos en desarrollo (M1) y vasos sanguíneos (M5) y estos no participan en la esteroidogénesis. Además, los resultados de este trabajo con Atropina sugieren que la Acetilcolina promueve el desarrollo folicular mediante sus receptores muscarínicos.

Por otro lado, se sugiere que los receptores muscarínicos no participan en la generación del modelo de fenotipo de ovario poli-quístico producido por estrés por frío, sino por el contrario la ACh promueve el desarrollo folicular.

Por otro lado, este trabajo sugiere que la Necroptosis promueve la degeneración de los folículos atrésicos y el paso de folículos tipo III a quistes, abriendo la posibilidad de intervenciones farmacológicas para patologías donde estas estructuras permanecen y alteran el correcto funcionamiento del ovario.

## 7. Bibliografía

- Acuna, E., R. Fornes, D. Fernandois, M. P. Garrido, M. Greiner, H. E. Lara, and A. H. Paredes. 2009. 'Increases in norepinephrine release and ovarian cyst formation during ageing in the rat', *Reprod Biol Endocrinol*, 7: 64.
- Bagnjuk, K., J. B. Stockl, T. Frohlich, G. J. Arnold, R. Behr, U. Berg, D. Berg, L. Kunz, C. Bishop, J. Xu, and A. Mayerhofer. 2019. 'Necroptosis in primate luteolysis: a role for ceramide', *Cell Death Discov*, 5: 67.
- Bansal, N., S. Sciabola, and G. Bhisetti. 2019. 'Understanding allosteric interactions in hMLKL protein that modulate necroptosis and its inhibition', *Sci Rep*, 9: 16853.
- Barra, R., G. Cruz, A. Mayerhofer, A. Paredes, and H. E. Lara. 2014. 'Maternal sympathetic stress impairs follicular development and puberty of the offspring', *Reproduction*, 148: 137-45.
- Barria, A., V. Leyton, S. R. Ojeda, and H. E. Lara. 1993. 'Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation', *Endocrinology*, 133: 2696-703.
- Bernuci, M. P., C. M. Leite, P. Barros, B. Kalil, G. B. Leoni, B. D. Bianco-Borges, C. R. Franci, R. E. Szawka, H. E. Lara, and J. A. Anselmo-Franci. 2012. 'Transitory activation of central and ovarian norepinephrine systems during cold stress-induced polycystic ovary in rats', *J Neuroendocrinol*.
- Bernuci, M. P., R. E. Szawka, C. V. Helena, C. M. Leite, H. E. Lara, and J. A. Anselmo-Franci. 2008. 'Locus coeruleus mediates cold stress-induced polycystic ovary in rats', *Endocrinology*, 149: 2907-16.
- Billig, H., I. Furuta, and A. J. Hsueh. 1993. 'Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis', *Endocrinology*, 133: 2204-12.
- Block, E. 1953. 'A quantitative morphological investigations of the follicular system in newborn female infants.', *Acta Anat (Basel)*, 17: 201-06.
- Blohberger, J., L. Kunz, D. Einwang, U. Berg, D. Berg, S. R. Ojeda, G. A. Dissen, T. Frohlich, G. J. Arnold, H. Soreq, H. Lara, and A. Mayerhofer. 2015. 'Readthrough acetylcholinesterase (AChE-R) and regulated necrosis: pharmacological targets for the regulation of ovarian functions?', *Cell Death Dis*, 6: e1685.
- Brawer, J. R., M. Munoz, and R. Farookhi. 1986. 'Development of the polycystic ovarian condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat', *Biol Reprod*, 35: 647-55.
- Brawer, J., M. Richard, and R. Farookhi. 1989. 'Pattern of human chorionic gonadotropin binding in the polycystic ovary', *Am J Obstet Gynecol*, 161: 474-80.
- Burden, H. W., and I. E. Lawrence, Jr. 1978. 'Experimental studies on the acetylcholinesterase-positive nerves in the ovary of the rat', *Anat Rec*, 190: 233-41.
- C.C. Paccola, C.G. Resende, T. Stumpp, S.M. Miraglia, I. Cipriano. 2013. 'The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis', *Anim Reprod*, 10 (4): 677-83.
- Chun, S. Y., K. M. Eisenhauer, S. Minami, H. Billig, E. Perlas, and A. J. Hsueh. 1996. 'Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor', *Endocrinology*, 137: 1447-56.
- Chun, S. Y., K. M. Eisenhauer, S. Minami, and A. J. Hsueh. 1996. 'Growth factors in ovarian follicle atresia', *Semin Reprod Endocrinol*, 14: 197-202.
- Conrad, M., J. P. Angeli, P. Vandenabeele, and B. R. Stockwell. 2016. 'Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities', *Nat Rev Drug Discov*, 15: 348-66.

- Cruz, M. E., A. Flores, B. E. Alvarado, C. G. Hernandez, A. Zarate, R. Chavira, M. Cardenas, I. Arrieta-Cruz, and R. Gutierrez-Juarez. 2015. 'Ovulation requires the activation on proestrus of M(1) muscarinic receptors in the left ovary', *Endocrine*, 49: 809-19.
- Degterev, A., J. Hitomi, M. Germscheid, I. L. Ch'en, O. Korkina, X. Teng, D. Abbott, G. D. Cuny, C. Yuan, G. Wagner, S. M. Hedrick, S. A. Gerber, A. Lugovskoy, and J. Yuan. 2008. 'Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins', *Nat Chem Biol*, 4: 313-21.
- Degterev, A., Z. Huang, M. Boyce, Y. Li, P. Jagtap, N. Mizushima, G. D. Cuny, T. J. Mitchison, M. A. Moskowitz, and J. Yuan. 2005. 'Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury', *Nat Chem Biol*, 1: 112-9.
- Degterev, A., D. Ofengeim, and J. Yuan. 2019. 'Targeting RIPK1 for the treatment of human diseases', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116: 9714-22.
- Del Campo, M., B. Piquer, J. Witherington, A. Sridhar, and H. E. Lara. 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.
- Delsouc, M. B., C. D. Bronzi, C. D. Becerra, M. M. Bonaventura, F. H. Mohamed, and M. Casais. 2019. 'Ganglionic and ovarian action of acetylcholine during diestrous II in rats. Neuroendocrine control of the luteal regression', *Steroids*, 148: 19-27.
- Delsouc, M. B., L. D. Morales, S. S. Vallcaneras, D. Bronzi, A. C. Anzulovich, S. M. Delgado, and M. Casais. 2016. 'Participation of the extrinsic cholinergic innervation in the action of nitric oxide on the ovarian steroidogenesis in the first proestrous in rats', *Gen Comp Endocrinol*, 236: 54-62.
- Deng, X. X., S. S. Li, and F. Y. Sun. 2019. 'Necrostatin-1 Prevents Necroptosis in Brains after Ischemic Stroke via Inhibition of RIPK1-Mediated RIPK3/MLKL Signaling', *Aging Dis*, 10: 807-17.
- Dissen Gregory A., Paredes A., Romero C., Les Dees W. 2004. 'Neural and Neurotrophic Control of Ovarian Development.' in, *The Ovary* (Elsevier Inc.).
- Dmitriev YuV, Minasian SM, Demchenko EA, Bayrasheva VK, Galagudza MM. 2017. 'Cardioprotective effects of necrostatin-1s and necrosulfonamide in the model of prolonged static cold storage of the donor rat heart.', *Arterial Hypertension*, 23: 4.
- Dong, W., M. Zhang, Y. Zhu, Y. Chen, X. Zhao, R. Li, L. Zhang, Z. Ye, and X. Liang. 2017. 'Protective effect of NSA on intestinal epithelial cells in a necroptosis model', *Oncotarget*, 8: 86726-35.
- Dorfman, M., S. Arancibia, J. L. Fiedler, and H. E. Lara. 2003. 'Chronic intermittent cold stress activates ovarian sympathetic nerves and modifies ovarian follicular development in the rat', *Biol Reprod*, 68: 2038-43.
- Du, Y., K. Bagnjuk, M. S. Lawson, J. Xu, and A. Mayerhofer. 2018. 'Acetylcholine and necroptosis are players in follicular development in primates', *Sci Rep*, 8: 6166.
- Dupont, E., F. Labrie, V. Luu-The, and G. Pelletier. 1992. 'Immunocytochemical localization of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase in human ovary', *J Clin Endocrinol Metab*, 74: 994-8.
- Fausser, B. C., and A. M. Van Heusden. 1997. 'Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences', *Endocr Rev*, 18: 71-106.
- Fritz, S., K. J. Föhr, S. Boddien, U. Berg, C. Brucker, and A. Mayerhofer. 1999. 'Functional and molecular characterization of a muscarinic receptor type and evidence for expression of choline-acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter in human granulosa-luteal cells', *J Clin Endocrinol Metab*, 84: 1744-50.
- Fritz, S., I. Wessler, R. Breitling, W. Rossmannith, S. R. Ojeda, G. A. Dissen, A. Amsterdam, and A. Mayerhofer. 2001. 'Expression of muscarinic receptor types in the primate

- ovary and evidence for nonneuronal acetylcholine synthesis', *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 349-54.
- Gerendai, I., K. Kocsis, and B. Halasz,. 2002. 'Supraspinal connections of the ovary: structural and functional aspects. ', *Microsc Res Tech.*, 59(6): p: 474-83.
- Gerendai, I., I. E. Toth, Z. Boldogkoi, I. Medveczky, and B. Halasz. 1998. 'Neuronal labeling in the rat brain and spinal cord from the ovary using viral transneuronal tracing technique', *Neuroendocrinology*, 68: 244-56.
- Greenfeld, C. R., J. K. Babus, P. A. Furth, S. Marion, P. B. Hoyer, and J. A. Flaws. 2007. 'BAX is involved in regulating follicular growth, but is dispensable for follicle atresia in adult mouse ovaries', *Reproduction*, 133: 107-16.
- Greenwald, G.S., Roy, S. 1994. *Follicular development and its Control* (Raven Press: New York, ).
- Greiner, M., A. Paredes, V. Araya, and H. E. Lara. 2005. 'Role of stress and sympathetic innervation in the development of polycystic ovary syndrome', *Endocrine*, 28: 319-24.
- He, S., L. Wang, L. Miao, T. Wang, F. Du, L. Zhao, and X. Wang. 2009. 'Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha', *Cell*, 137: 1100-11.
- Hirshfield, A. N. 1989. 'Granulosa cell proliferation in very small follicles of cycling rats studied by long-term continuous tritiated-thymidine infusion', *Biol Reprod*, 41: 309-16.
- Hirshfield, A. N., and A. R. Midgley, Jr. 1978. 'Morphometric analysis of follicular development in the rat', *Biol Reprod*, 19: 597-605.
- Hojo, T., M. J. Siemieniuch, K. Lukasik, K. K. Piotrowska-Tomala, A. W. Jonczyk, K. Okuda, and D. J. Skarzynski. 2016. 'Programmed necrosis - a new mechanism of steroidogenic luteal cell death and elimination during luteolysis in cows', *Sci Rep*, 6: 38211.
- Hsueh, A. J., E. Y. Adashi, P. B. Jones, and T. H. Welsh, Jr. 1984. 'Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells', *Endocr Rev*, 5: 76-127.
- Hussein, M. R. 2005. 'Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms', *Hum Reprod Update*, 11: 162-77.
- Iismaa, T. P., E. A. Kerr, J. R. Wilson, L. Carpenter, N. Sims, and T. J. Biden. 2000. 'Quantitative and functional characterization of muscarinic receptor subtypes in insulin-secreting cell lines and rat pancreatic islets', *Diabetes*, 49: 392-8.
- Jouan-Lanhouet, S., F. Riquet, L. Duprez, T. Vanden Berghe, N. Takahashi, and P. Vandenabeele. 2014. 'Necroptosis, in vivo detection in experimental disease models', *Semin Cell Dev Biol*, 35: 2-13.
- K., Spanel-Borowski. 2012. *Follicle stages and follicular atresia. In: Atlas of the Mammalian Ovary*.
- Kaipia, A., and A. J. Hsueh. 1997. 'Regulation of ovarian follicle atresia', *Annu Rev Physiol*, 59: 349-63.
- Kozłowska, A., M. Majewski, and B. Jana. 2014. 'Changes in the cholinergic innervation pattern of porcine ovaries with cysts induced by dexamethasone administration', *J Mol Neurosci*, 54: 10-9.
- Kunz, L., A. Thalhammer, F. D. Berg, U. Berg, D. M. Duffy, R. L. Stouffer, G. A. Dissen, S. R. Ojeda, and A. Mayerhofer. 2002. 'Ca<sup>2+</sup>-activated, large conductance K<sup>+</sup> channel in the ovary: identification, characterization, and functional involvement in steroidogenesis', *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 5566-74.
- Lara, H. E., G. A. Dissen, V. Leyton, A. Paredes, H. Fuenzalida, J. L. Fiedler, and S. R. Ojeda. 2000. 'An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low

- affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat', *Endocrinology*, 141: 1059-72.
- Lara, H. E., M. Dorfman, M. Venegas, S. M. Luza, S. L. Luna, A. Mayerhofer, M. A. Guimaraes, E. Silva A. A. Rosa, and V. D. Ramirez. 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.
- Lara, H.E., J.K. McDonald, and S.R. Ojeda. 1990. 'Involvement of nerve growth factor in female sexual development.', *Endocrinology*, 126(1): p. 364-75.
- Lawrence, I. E., Jr., and H. W. Burden. 1980. 'The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary', *Anat Rec*, 196: 51-9.
- Levine, B., and J. Yuan. 2005. 'Autophagy in cell death: an innocent convict?', *J Clin Invest*, 115: 2679-88.
- Li, J. X., J. M. Feng, Y. Wang, X. H. Li, X. X. Chen, Y. Su, Y. Y. Shen, Y. Chen, B. Xiong, C. H. Yang, J. Ding, and Z. H. Miao. 2014. 'The B-Raf(V600E) inhibitor dabrafenib selectively inhibits RIP3 and alleviates acetaminophen-induced liver injury', *Cell Death Dis*, 5: e1278.
- Liu, S., H. Liu, A. Johnston, S. Hanna-Addams, E. Reynoso, Y. Xiang, and Z. Wang. 2017. 'MLKL forms disulfide bond-dependent amyloid-like polymers to induce necroptosis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: E7450-E59.
- Malamed, S., J. A. Gibney, and S. R. Ojeda. 1992. 'Ovarian innervation develops before initiation of folliculogenesis in the rat', *Cell Tissue Res*, 270: 87-93.
- Marcondes, F. K., F. J. Bianchi, and A. P. Tanno. 2002. 'Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations', *Braz J Biol*, 62: 609-14.
- Matsuda-Minehata, F., N. Inoue, Y. Goto, and N. Manabe. 2006. 'The regulation of ovarian granulosa cell death by pro- and anti-apoptotic molecules', *J Reprod Dev*, 52: 695-705.
- Mayerhofer, A., K. J. Fohr, K. Sterzik, and M. Gratzl. 1992. 'Carbachol increases intracellular free calcium concentrations in human granulosa-lutein cells', *J Endocrinol*, 135: 153-9.
- Mayerhofer, A., and S. Fritz. 2002. 'Ovarian acetylcholine and muscarinic receptors: hints of a novel intrinsic ovarian regulatory system', *Microsc Res Tech*, 59: 503-8.
- Mayerhofer, A., and L. Kunz. 2005. 'A non-neuronal cholinergic system of the ovarian follicle', *Ann Anat*, 187: 521-8.
- McGee, E. A., and A. J. Hsueh. 2000. 'Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles', *Endocr Rev*, 21: 200-14.
- McGee, E. A., E. Perlas, P. S. LaPolt, A. Tsafiriri, and A. J. Hsueh. 1997. 'Follicle-stimulating hormone enhances the development of preantral follicles in juvenile rats', *Biol Reprod*, 57: 990-8.
- Meng, L., S. Z. Jan, G. Hamer, A. M. van Pelt, I. van der Stelt, J. Keijer, and K. J. Teerds. 2018. 'Preantral follicular atresia occurs mainly through autophagy, while antral follicles degenerate mostly through apoptosis', *Biol Reprod*, 99: 853-63.
- Moreno-Gonzalez, G., P. Vandenabeele, and D. V. Krysko. 2016. 'Necroptosis: A Novel Cell Death Modality and Its Potential Relevance for Critical Care Medicine', *Am J Respir Crit Care Med*, 194: 415-28.
- Oerlemans, M. I., J. Liu, F. Arslan, K. den Ouden, B. J. van Middelaar, P. A. Doevendans, and J. P. Sluijter. 2012. 'Inhibition of RIP1-dependent necrosis prevents adverse cardiac remodeling after myocardial ischemia-reperfusion in vivo', *Basic Res Cardiol*, 107: 270.
- Osman, P. 1985. 'Rate and course of atresia during follicular development in the adult cyclic rat', *J Reprod Fertil*, 73: 261-70.

- Pacak, K., J. S. Baffi, R. Kvetnansky, D. S. Goldstein, and M. Palkovits. 1998. 'Stressor-specific activation of catecholaminergic systems: implications for stress-related hypothalamic-pituitary-adrenocortical responses', *Adv Pharmacol*, 42: 561-4.
- Pacak, K., M. Palkovits, G. Yadid, R. Kvetnansky, I. J. Kopin, and D. S. Goldstein. 1998. 'Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity', *Am J Physiol*, 275: R1247-55.
- Pajokh, M., F. Mesbah, H. Bordbar, and T. Talaei-Khozani. 2018. 'Different cell death types determination in juvenile mice ovarian follicles', *Iran J Vet Res*, 19: 298-303.
- Park, E., J. F. Cockrem, K. H. Han, D. H. Kim, M. H. Jung, and J. P. Chu. 2012. 'Stress-induced activation of ovarian heat shock protein 90 in a rat model of polycystic ovary syndrome', *J Obstet Gynaecol Res*, 38: 396-407.
- Qinli, Z., L. Meiqing, J. Xia, X. Li, G. Weili, J. Xiuliang, J. Junwei, Y. Hailan, Z. Ce, and N. Qiao. 2013. 'Necrostatin-1 inhibits the degeneration of neural cells induced by aluminum exposure', *Restor Neurol Neurosci*, 31: 543-55.
- Rajah, R., E. M. Glaser, and A. N. Hirshfield. 1992. 'The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis', *Dev Dyn*, 194: 177-92.
- Ricu, M. A., V. D. Ramirez, A. H. Paredes, and H. E. Lara. 2012. 'Evidence for a Celiac Ganglion-Ovarian Kisspeptin Neural Network in the Rat: Intraovarian Anti-Kisspeptin Delays Vaginal Opening and Alters Estrous Cyclicity', *Endocrinology*.
- Ricu, M., A. Paredes, M. Greiner, S. R. Ojeda, and H. E. Lara. 2008. 'Functional development of the ovarian noradrenergic innervation', *Endocrinology*, 149: 50-6.
- Riquelme, R., F. Ruz, A. Mayerhofer, and H. E. Lara. 2019. 'Role of ovarian sympathetic nerves and cholinergic local system during cold stress', *J Endocrinol*, 242: 115-24.
- . 2020. 'Huperzine-A administration recovers rat ovary function after sympathetic stress', *J Neuroendocrinol*: e12914.
- Rommel, F. R., B. Raghavan, R. Paddenberg, W. Kummer, S. Tumala, G. Lochnit, U. Gieler, and E. M. Peters. 2015. 'Suitability of Nicotinic Acetylcholine Receptor alpha7 and Muscarinic Acetylcholine Receptor 3 Antibodies for Immune Detection: Evaluation in Murine Skin', *J Histochem Cytochem*, 63: 329-39.
- Sommersberg, B., A. Bulling, U. Salzer, U. Frohlich, R. E. Garfield, A. Amsterdam, and A. Mayerhofer. 2000. 'Gap junction communication and connexin 43 gene expression in a rat granulosa cell line: regulation by follicle-stimulating hormone', *Biol Reprod*, 63: 1661-8.
- Squicciarini, V., R. Riquelme, K. Wilsterman, G. E. Bentley, and H. E. Lara. 2018. 'Role of RFRP-3 in the development of cold stress-induced polycystic ovary phenotype in rats', *J Endocrinol*, 239: 81-91.
- Sun, L., H. Wang, Z. Wang, S. He, S. Chen, D. Liao, L. Wang, J. Yan, W. Liu, X. Lei, and X. Wang. 2012. 'Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase', *Cell*, 148: 213-27.
- Teerds, K. J., and J. H. Dorrington. 1993. 'Immunohistochemical localization of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat ovary during follicular development and atresia', *Biol Reprod*, 49: 989-96.
- Uchida, S. 2014. 'Cholinergic vasodilative system in the cerebral cortex: effects of acupuncture and aging', *J Acupunct Meridian Stud*, 7: 173-9.
- Urra, J., J. Blohberger, M. Tiszavari, A. Mayerhofer, and H. E. Lara. 2016. 'In vivo blockade of acetylcholinesterase increases intraovarian acetylcholine and enhances follicular development and fertility in the rat', *Sci Rep*, 6: 30129.
- Van Wagenen G, Simpson ME 1965. *Embryology of the Ovary and Testis; Homo sapiens and Macaca mulatta* (Yale University Press: New Haven, CT).

- Vanden Berghe, T., A. Linkermann, S. Jouan-Lanhouet, H. Walczak, and P. Vandenabeele. 2014. 'Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15: 135-47.
- W.-D. Foote, C. Thibault, Micheline Gérard, Anne-Marie Mélières. 1969. 'Recherches expérimentales sur la maturation in vitro des ovocytes de truie et de veau', *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique*, 9: pp.329-49.
- Wang, H., L. Sun, L. Su, J. Rizo, L. Liu, L. F. Wang, F. S. Wang, and X. Wang. 2014. 'Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3', *Mol Cell*, 54: 133-46.
- Wang, Y., J. Wang, H. Wang, X. Feng, Y. Tao, J. Yang, and J. Cai. 2018. 'Necrosulfonamide Attenuates Spinal Cord Injury via Necroptosis Inhibition', *World Neurosurg*, 114: e1186-e91.
- Zangeneh, F. Z., A. Abdollahi, P. Tavassoli, and M. M. Naghizadeh. 2011. 'The effect of cold stress on polycystic ovary syndrome in rat: before and during modeling', *Arch Gynecol Obstet*, 284: 651-7.
- Zhou, W., and J. Yuan. 2014. 'Necroptosis in health and diseases', *Semin Cell Dev Biol*, 35: 14-23.
- Ziegler, U., and P. Groscurth. 2004. 'Morphological features of cell death', *News Physiol Sci*, 19: 124-8.